



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Hematologia

Linfocitose Hemofagocítica Primária e Secundária: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento

Marisa Andreia Oliveira Roldão

JUNHO'2017



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Hematologia

Linfohistiocitose Hemofagocítica Primária e Secundária: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento

Marisa Andreia Oliveira Roldão

Orientado por:

Dr. Eduardo Lima da Silva Espada

JUNHO'2017

RESUMO

A Linfohistiocitose Hemofagocítica(LHH) é uma síndrome hiperinflamatória rara, mas cuja incidência anual tem vindo a aumentar, sendo estimada em aproximadamente em 1/300000 recém-nascidos na América do Norte e até 7/10000 recém-nascidos na Turquia.

A *Histiocyte Society* classifica a LHH em primária, associada a defeitos genéticos na citotoxicidade ou a síndromes ligadas ao albinismo, linfoproliferativas ligadas ao X e, mais recentemente, imunodeficiências primárias; e secundária/adquirida, desencadeada por infeções, doenças autoimunes ou neoplásicas, sendo o desencadeante mais prevalente em todos os estudos o EBV. Todavia, a evidência mostra sobreposição entre as variantes, correspondendo os desencadeantes secundários a importantes ativadores da síndrome nas formas genéticas.

O crescente conhecimento em relação á fisiopatologia tem sugerido diversos mecanismos patológicos que confluem num *endpoint* fenotípico comum, caracterizado por inflamação extrema, proliferação e ativação descontrolada e ineficaz de células T CD8⁺, NK e macrófagos, hipercitocinémia e lesão multiorgânica.

As manifestações mais frequentes incluem febre, hepatoesplenomegália, citopénias, hiperferritinémia, hipertrigliceridémia e elevação de sCD25, sendo semelhantes nas crianças e adultos, mas com frequências, especificidade e sensibilidade enquanto marcadores de diagnóstico distintas. A aplicação do protocolo diagnóstico vigente HLH-2004 é controversa em adultos, tendo sido apresentadas alternativas sem grande adesão internacional.

O tratamento deve ser etiológicamente dirigido na LHH secundária, podendo, contudo, ser iniciada terapêutica específica precoce de acordo com o protocolo HLH-94, à semelhança do que ocorre nas formas genéticas, nos casos mais graves ou refratários. O TPH com condicionamento de intensidade reduzida tem revelado melhoria da sobrevida, em idade pediátrica, sendo, contudo, a sua realização em adultos mais controversa.

Palavras Chave: linfohistiocitose hemofagocítica, inflamação extrema, hipercitocinémia, falência multiorgânica

“O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML”

ABSTRACT

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare hyperinflammatory syndrome but its annual incidence has been increasing, estimated at approximately 1/300 000 newborns in North America and up to 7/10 000 newborns in Turkey.

Histiocyte Society classifies HLH in primary associated with genetic defects in cytotoxicity or albinism-related syndromes, X-linked lymphoproliferative diseases and, more recently, primary immunodeficiencies; and secondary/acquired, triggered by infections, autoimmune or neoplastic diseases, with EBV as the most prevalent trigger in all published studies. However, evidence shows an overlap between the variants, with secondary triggers as important activators of the syndrome in genetic forms.

Increased knowledge regarding pathophysiology has suggested several pathological mechanisms that converge in a common phenotypic endpoint characterized by extreme inflammation, proliferation and uncontrolled and ineffective activation of CD8⁺ T cells, NK and macrophages, hypercytokinemia and multiorgan damage.

The most frequent manifestations include fever, hepatosplenomegaly, cytopenias, hyperferritinemia, hypertriglyceridemia and elevation of sCD25, similar in children and adults, but with distinct frequencies, specificity and sensitivity as diagnostic markers. The application of the current HLH-2004 diagnostic protocol is controversial in adults, with alternatives presented without great international adherence.

Treatment should be etiologically directed at secondary HLH. However, early specific therapy may be initiated according to the HLH-94 protocol, similarly to what occurs in genetic forms, in the most severe or refractory cases. HSCT with reduced intensity conditioning has been shown to improve survival at pediatric age, but its performance in adults is more controversial.

Keywords: *hemophagocytic lymphohistiocytosis, extreme inflammation, hypercytokineemia, multiorgan failure*

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE	III
INTRODUÇÃO	1
CLASSIFICAÇÃO	2
EPIDEMIOLOGIA	4
FISIOPATOLOGIA	4
LHH familiar	5
LHH ligada a Síndromes associadas ao Albinismo, Linfoproliferativas ligadas ao X e outras Imunodeficiências primárias	8
LHH secundária	9
Infecções	9
Doenças malignas.....	11
Doenças autoimunes.....	13
MANIFESTAÇÕES DA SÍNDROME	14
Manifestações Clínicas.....	14
Alterações Laboratoriais e Imunológicas	17
Alterações Histológicas.....	21
DIAGNÓSTICO	22
Critérios de Diagnóstico.....	24
Particularidades Diagnósticas LHH/Doença Maligna.....	26
TRATAMENTO	27
Terapêutica de Indução ⁴	28
Terapêutica de Continuação ⁴	30
Terapêutica de Resgate.....	31
Transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos.....	32
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

INTRODUÇÃO

A Linfohistiocitose Hemofagocítica (LHH) é uma síndrome hiperinflamatória rara, potencialmente fatal, associada a um conjunto de sinais e sintomas consequentes de ativação imune extrema e ineficaz e a disfunção multiorgânica rapidamente progressiva na ausência de tratamento. Esta síndrome foi inicialmente descrita em 1939 por Scott e Robb-Smith¹ e posteriormente em 1952 por Farquhar e Claireaux², tendo sido designada de “Reticulocitose Hemofagocítica Familiar” e considerada uma doença exclusiva da infância. Posteriormente foram descritas formas esporádicas da síndrome em crianças e adultos, relacionadas com infeções, doenças autoimunes/reumatológicas e neoplásicas.

Na última década a LHH tem adquirido notoriedade devido a um aparente inexplicável aumento da sua incidência. As suas bases imunopatológicas e moleculares têm sido alvo de intenso estudo e o conhecimento crescente proporcionado novas estratégias de diagnóstico e terapêutica precoce. Todavia, a raridade, a inespecificidade de sinais e sintomas, a complexidade de etiologias possíveis e a sobreposição entre variante primária e secundária da síndrome continuam a representar obstáculos à redução da morbilidade e mortalidade.

Assim, este trabalho visa uma abordagem panorâmica das variantes primárias e secundárias de LHH, cuja distinção não se resume ao parâmetro etário, e em que alterações moleculares/genéticas e desencadeantes secundários sejam transversais, revendo os avanços na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos, nos marcadores e critérios de diagnóstico e na terapêutica.

De facto, os estudos publicados na literatura baseiam-se maioritariamente em evidência em idade pediátrica, sendo os resultados extrapolados para os adultos, pelo que os protocolos indicados pela *Histiocyte Society*, HLH-94³ e HLH-2004⁴, para o diagnóstico e tratamento da síndrome são comuns a crianças e adultos. Este trabalho procura uma revisão da especificidade e sensibilidade dos marcadores de diagnóstico nas diversas faixas etárias, a inclusão de novos marcadores potencialmente úteis no diagnóstico precoce, particularmente no adulto, e de estratégias terapêuticas, designadamente o Transplante de Progenitores Hematopoiéticos com condicionamento pré-transplante de intensidade reduzida, cujos resultados parecem promissores no aumento da sobrevida a longo prazo.

CLASSIFICAÇÃO

A *Histiocyte Society* classifica a LHH em primária, associada a mutações genéticas que se traduzem em defeitos na via citotóxica de células NK e linfócitos T CD8⁺, e que se manifesta essencialmente durante a infância; e secundária ou adquirida, que pode ocorrer em qualquer idade, sendo desencadeada por *triggers* como infeções, doenças autoimunes, neoplásicas, dermatológicas, metabólicas congénitas ou outras histiocitoses, na ausência de defeitos genéticos identificáveis.

As variantes primárias incluem a Linfohistiocitose Hemofagocítica Familiar (LHF), as síndromes linfoproliferativas ligadas ao X tipo I e tipo II, as síndromes associadas ao albinismo, designadamente, síndrome de Griscelli tipo II e síndrome de Chédiak-Higashi, mutações da ITK e mutações CD27. Doentes com estas variantes apresentam elevada taxa de recorrência.

Foi ainda descrita a associação entre imunodeficiências primárias não diretamente relacionadas com a maquinaria citolítica e a LHH, mormente as síndromes de imunodeficiência combinada e as doenças granulomatosas crónicas.^{5,6}

A LHF apresenta transmissão autossómica recessiva, pelo que pode não existir história familiar da doença. Aproximadamente 80% dos casos ocorrem em crianças com menos de um ano de idade.⁷

Até à data foram descritas mutações em 4 genes associados à LHF: PRF1, UNC13D, STX11 e STXB2. As mutações génicas identificadas apresentam grande heterogeneidade, confluindo, contudo, para um fenótipo comum caracterizado por defeitos na função da perforina ou outras proteínas envolvidas na síntese, transporte e exocitose de grânulos citotóxicos pelas células NK e T. (*figura 1*)

Gholam et al (2011) estimam que aproximadamente 50% dos casos de LHF na América do Norte resultem de defeitos genéticos na perforina.⁸

LHH primária/genética		
Subtipo	Gene/Proteína	Localização
LHF tipo 1	Desconhecidos	9q21.3-locus6
LHF tipo 2	PRF1/Perforina	10q21-22
LHF tipo 3	UNC13D/Munc13-4	17q25
LHF tipo 4	STX11/Syntaxina 11	6q24
LHF tipo 5	STXB2/UNC18B	19p13
Síndrome de Griscelli tipo 2	RAB27A/Rab27a	15q21
Síndrome de Chédiak-Higashi	LYST/Lyst	1q42.1
XLP tipo 1	SH2D1A/SAP	Xp25
XLP tipo 2	BIRC4/XIAP	Xp25

Tabela. 1 - Subtipos de LHH primária. XLP (síndrome linfoproliferativa ligada ao X)

A forma adquirida, mais frequente que a forma genética, pode ser reativa a diversas condições, mais frequentemente, infecções (virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias), com especial ênfase para a LHH associada ao vírus EBV, doenças reumatológicas/autoimunes e doenças neoplásicas, particularmente hemato-oncológicas, ou iatrogénica. (figura 2)

Rivière et al (2014), no seu estudo multicêntrico com uma amostra de 162 adultos com critérios de diagnóstico para LHH identificaram as doenças hemato-oncológicas como principal *trigger* da doença em adultos, estando presente em 56% dos seus casos de estudo. De entre os restantes casos, 25% apresentavam infeção.⁹ Este valor é corroborado por diversos estudos unicêntricos que estimam a percentagem de adultos com LHH reativa a processos infecciosos em 23 a 41% e a doenças reumatológicas/autoimunes em 8 a 20%. Em todos os estudos referidos o agente infeccioso mais prevalente foi o vírus EBV, encontrando-se os níveis de DNA-EBV circulantes mais elevados associados a pior prognóstico.^{10,11}

A classificação da doença em primária e secundária, embora importante nas decisões terapêuticas, apresenta limitações. De fato, existem casos descritos na literatura de adultos com mais de 62 anos com defeitos moleculares na perforina e outros genes associados a LHH familiar¹², o que indicia que, embora frequentemente associada à infância, a variante primária da doença se possa manifestar de forma inaugural na idade adulta. Do mesmo modo, Clementi et al (2002) referem os processos infecciosos como *triggers* comuns em crianças com a variante familiar da doença.¹³

LHH secundária/reativa			
Infeções	D. Malignas	D. Auto-imunes	Outras
1. Virais - EBV - HSV - HIV - CMV - Adenovírus, HCV, HBV; H1N1, Rubéola, Varicela, Parvovírus B19 - Outros; 2. Bacterias 3. Fungos 4. Parasitas: - <i>Leishmania spp.</i> - <i>Plasmodium spp.</i> (vivax, falciparum) - <i>Toxoplasma spp.</i>	1. Hematopoiéticas - Linfoma/leucemia T/NK - Linfoma T periférico - Linfoma T anaplásico - Leucemia Aguda - Linfoma de Hodgkin - Linfomas não-Hodgkin B 2. Tumores Sólidos - Hepatocelular - Prostata - Pulmão	- LES - AJSI - Kawasaki - AR - Doença de Still	- D. dermatológicas - D. metabólicas congénitas - Histiocitoses

Tabela. 2 – Etiologias de LHH secundária. LES (lúpus eritematoso sistémico), AJSI (artrite juvenil sistémica idiopática), AR (artrite reumatoide)

EPIDEMIOLOGIA

Os dados epidemiológicos relativos à incidência de LHH são ainda bastante limitados, particularmente em adultos, revelando grande variabilidade de acordo com a área geográfica. Todavia, o número de casos descritos na literatura tem aumentado exponencialmente na última década. Estudos prévios estimavam a incidência anual de LHH familiar em 1.2/ 1000000 recém-nascidos.^{14,15} Revisões mais recentes apontam para uma incidência de 1/300000 recém-nascidos na América do Norte.¹⁶ Um estudo levado a cabo nos principais hospitais pediátricos do Texas refere inclusivamente uma incidência de 1/100000 crianças por ano.¹⁷

No Japão, uma pesquisa a nível nacional de casos em idade pediátrica e adulta permitiu estimar a incidência anual da doença neste país em aproximadamente 1/ 800000 pessoas, correspondendo 90% dos casos a LHH secundária.¹⁸

A Turquia tem vindo a destacar-se como um dos países com maior incidência, estimada em 7/10000 crianças, o que se pensa dever-se a níveis elevados de consanguinidade e alta prevalência de anomalias genéticas na via citotóxica.¹⁹

De facto, a frequência de mutações específicas associadas à LHH parece variar de acordo com a etnia. Enquanto nos africanos, hispânicos e árabes as mutações mais frequentes ocorrem no gene PRF1; na etnia branca ocorrem com maior frequência no gene UNC13D. Os turcos parecem apresentar uma elevada prevalência de mutações nos quatro genes associados à LHH familiar (PRF1, UNC13D, STX11 e STXBP2).^{20,21}

FISIOPATOLOGIA

A Linfohistiocitose Hemofagocítica é uma síndrome hiperinflamatória que resulta de uma resposta imune exagerada, desajustada e ineficaz, com excessiva estimulação linfo-macrofagocitária resultando na infiltração dos tecidos por macrófagos e linfócitos ativados, eritrofagocitose e hipercitocinémia, o que se traduz em múltiplas lesões de órgão-alvo, potencialmente fatais.

Os seus mecanismos fisiopatológicos são complexos e ainda não inteiramente conhecidos. A evidência mostra que os diferentes subgrupos de doentes, embora partilhem um *endpoint* fenotípico comum, com características clínicas e laboratoriais semelhantes, apresentam mecanismos patológicos subjacentes à síndrome distintos.

LHH familiar

A variante familiar resulta de defeitos genéticos que condicionam a imunidade celular, provocando alterações na maquinaria citolítica das células efectoras T CD8⁺ e NK.

Estas células desempenham ação citotóxica, particularmente sob células infectadas por vírus ou bactérias intracelulares e/ou tumorais através de dois mecanismos indutores de morte celular, via Fas/Fas ligando, com consequente ativação da cascata das caspases, ou através da exocitose de grânulos citolíticos, em que uma vez reconhecida a célula alvo via MHC I ou MHC II, as células citotóxicas mobilizam os grânulos citoplasmáticos, que se fundem com a membrana celular e libertam na fenda imunológica os seus componentes.²² Os grânulos, derivados lisossómicos, são constituídos por uma matriz proteoglicana, perforina, granulísina e diversas proteases serinas designadas granzimas.²²

A perforina, semelhante ao C9, forma poros na membrana da célula alvo, permitindo a entrada das granzimas que desencadeiam apoptose pela ativação da cascata das caspases ou dano nucleotídico direto. A granulísina representa uma via alternativa indutora de lesão membranar na célula alvo.²³ Este processo é desencadeado e rigorosamente controlado por reguladores proteicos.

O transporte intracelular dos grânulos é mediado por proteínas motoras como a cinesina e a dineína, que se acoplam aos microtúbulos citoplasmáticos permitindo a mobilização dos grânulos até à proximidade da membrana plasmática, local onde ocorre a secreção dos seus componentes. Os grânulos, como qualquer organelo do sistema endomembranar, possuem marcadores moleculares superficiais, designadamente proteínas da família Ras, numa combinação única e específica. A família de proteínas transmembranares SNAREs constituem um local de reconhecimento adicional que favorece este processo.²⁴

Até à data foram descritas múltiplas mutações em quatro genes (PRF1, UNC13-4, STX11 e STXB2), que se traduzem em defeitos nesta via da citotoxicidade, manifestando-se sob a forma de LHH. Estas mutações apresentam tipicamente transmissão hereditária autossómica recessiva.²⁵⁻²⁹

Os doentes com LHH familiar apresentam além de défice da função citotóxica de células T CD8⁺ e NK, hiperatividade linfocítica T, detetável através dos níveis aumentados de recetor IL-2 solúvel.

A atividade linfocítica T excessiva resulta na hiperprodução de citocinas, nomeadamente IFN- γ , que funciona como potente estimulador macrofagocitário. A

amplificação da resposta imunitária origina uma “tempestade de citocinas”, característica dos estados hiperinflamatórios, com valores de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e M-CSF elevados.³⁰ Os níveis de IL-16 encontram-se igualmente aumentados, podendo estar associados a uma resposta de recrutamento macrofagocitário TH₁-mediada.³¹

Estas anomalias foram igualmente descritas em modelos animais, amplamente utilizados no estudo dos mecanismos fisiopatológicos da doença, designadamente em ratos com mutações nos genes da perforina e que após infecção viral (pelo Vírus Coromeningeo Linfocítico) desenvolvem manifestações clínicas e laboratoriais semelhantes às encontradas na LHH. Os estudos de Jordan et al(2004) e Jessen et al (2013) nestes modelos corroboram a ideia de que a hiperatividade linfocítica e a sobreprodução de IFN- γ desempenham um papel preponderante e necessário ao desenvolvimento da doença.^{32,33}

Diversas hipóteses procuram explicar de que forma os defeitos na função citotóxica em doentes com LHH familiar contribuem para a hiperativação imunológica observada na doença.

Ao contrário do que sucede nos doentes com LHH associada a imunodeficiência primária, em que a hiperativação imune parece ser diretamente despoletada por processos infecciosos disseminados e consequente carga patogénica persistentemente elevada, nos doentes com LHH familiar não é possível encontrar de forma consistente em todos os doentes evidência de infecção ativa. O estudo de Lykens et al(2011), nos modelos animais supracitados, corrobora a ideia de que a hiperatividade imunológica nestes doentes não está diretamente relacionada com a carga patogénica, parecendo dever-se ao aumento e prolongamento da apresentação antigénica. Estes resultados não excluem a infecção como potencial *trigger*, antes sugerem que a função citotóxica poderá desempenhar uma ação autorreguladora da resposta imunitária, sob as células apresentadoras de antígeno, distinta do seu papel na clearance patogénica.³⁴

Na realidade, diferentes estudos têm descrito a eliminação de células dendríticas exógenas, portadoras de antígeno, por mecanismos dependentes da ação citotóxica mediada por grânulos de células T e NK.

As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno altamente especializadas, que funcionam como “sentinelas” capazes de detetar, internalizar e processar antígenos periféricos. As células dendríticas presentes nos tecidos periféricos, expostas a níveis crescentes de TNF- α , IL-1 β migram para os gânglios linfáticos regionais, local onde ocorre a sua ativação final, induzida pela interação com células T

antígeno-específicas através da ligação CD40 ligando (células T)/CD40 recetor (células dendríticas). Uma vez ativadas, estas estimulam a proliferação e diferenciação de células T *naïve* em T CD8⁺ e T CD4⁺.

Hermans et al (2000) e Yang et al (2006) estudaram a resposta imunitária após inoculação com células dendríticas portadores de antígeno exógenas em ratos, tendo verificado a rápida eliminação periférica destas células por mecanismos citolíticos T CD8⁺ dependentes da perforina, quando comparadas com células dendríticas não portadoras de antígeno. A ocorrência deste mecanismo de clearance a nível periférico sugere que a eliminação de células apresentadoras de antígeno mediada pelos linfócitos T CD8⁺ funciona como uma barreira que as impede de alcançar os gânglios regionais, interagir com células T *naïve* e perpetuar indefinidamente a expansão linfocítica, funcionando como um mecanismo de *feedback* negativo.^{35,36}

Pelo contrário, ratos com defeitos genéticos na perforina, após inoculação com células dendríticas portadoras de antígeno desenvolvem respostas imunitárias exageradas, com aumento acentuado e progressivo da contagem de linfócitos T CD8⁺.

Andrew et al (2010) sugerem que as células NK possam também contribuir para a clearance das células apresentadoras de antígeno, limitando a resposta linfocítica T, nomeadamente contra vírus, diminuindo a duração da exposição antigénica a que estas células estão sujeitas.³⁷

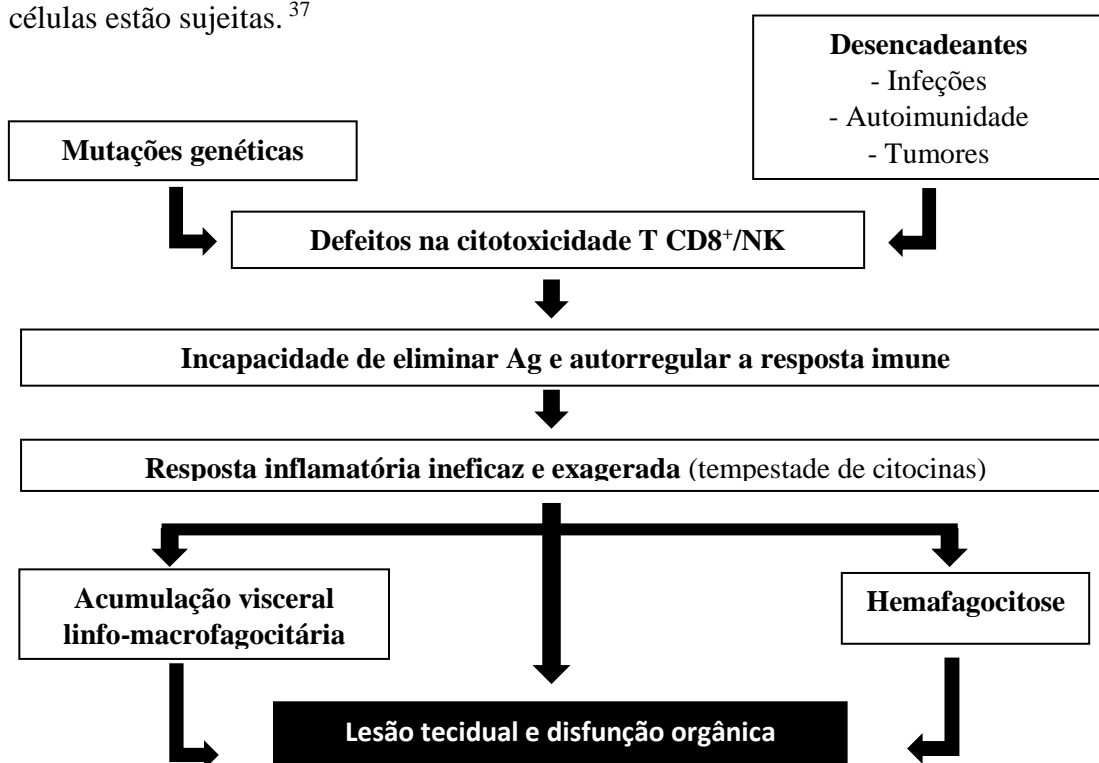


Fig. 1- Fisiopatologia da LHH Familiar

LHH ligada a Síndromes associadas ao Albinismo, Linfoproliferativas ligadas ao X e outras Imunodeficiências primárias

O transporte intracelular e exocitose de proteínas através de vesículas secretórias não é um mecanismo exclusivo de células NK e T citotóxicas, encontrando-se presente em diversos outros tipos celulares, como macrófagos, granulócitos, plaquetas, melanócitos e neurónios. Assim, ao contrário do que ocorre na LHF em que as manifestações se restringem ao sistema imunitário, outras síndromes associadas a defeitos no transporte vesicular em diferentes tipos celulares, como as síndromes de Griscelli tipo 2, Chédiak-Higashi e Linfoproliferativas ligadas ao X tipo 1 e tipo 2, podem apresentar-se sob a forma de LHH associada a outras manifestações.³⁸⁻⁴³

Outras imunodeficiências primárias, não relacionadas diretamente com a função citotóxica, podem igualmente manifestar-se sob a forma de LHH. No estudo retrospectivo de Bode et al (2015), com uma amostra de 63 doentes portadores de uma imunodeficiência primária que não as supracitadas e que cumpriam critérios de diagnóstico para LHH, 80% apresentavam Imunodeficiência Combinada ou Doença Granulomatosa Crónica. Em mais de 50 % dos casos a LHH foi a manifestação inaugural da doença. Dos doentes com Imunodeficiência Combinada um terço apresentava Imunodeficiência Combinada Grave (*severe combined immunodeficiency – SCID*) e os restantes, outras associadas a defeitos na contagem ou função linfocítica T, manifestando-se a doença na maioria antes do 1º ano de idade, sendo desencadeada por infeções virais. Nos doentes com Doença Granulomatosa Crónica, a LHH manifestava-se mais tarde, após o 1º ano de idade, em alguns casos durante a fase adulta, encontrando-se relacionada com infeções bacterianas, designadamente *Burkholderia cepacia* e *Leishmania spp.*, ou fúngicas.⁵

Nos doentes com imunodeficiência primária, a LHH parece decorrer da incapacidade de combate e eliminação dos agentes patogénicos associada a processos infecciosos constantes e disseminados. Nestes, a hiperativação imunitária aparenta depender diretamente da carga patogénica persistentemente elevada, o que é corroborado pela evidência consistente de infeção.⁶ Além do mais, a LHH nestes doentes desenvolve-se mesmo com contagens baixas ou indetetáveis de linfócitos T e células NK, existindo uma ativação macrofagocitária e hipercitocinémia independentes da atuação linfocitária, por mecanismos ainda não esclarecidos. Nestes doentes os níveis de IL-2R são francamente mais baixos, e os níveis ferritina parecem ser superiores.^{5,6} Vários autores

propõe o rácio Ferritina/IL-2R como marcador diagnóstico precoce de LHH associada a imunodeficiência primária.

LHH secundária

Embora a *Histiocyte Society* classifique a LHH secundária como uma patologia reativa a *triggers* na ausência de distúrbios genéticos hereditários identificáveis, a evidência mais recente sugere que doentes com esta variante, particularmente adultos, apresentem mutações de apresentação tardia, mais frequentemente, heterozigóticas, com impacto na via citotóxica, diminuindo o limiar de ativação imune e desencadeando respostas exageradas e desajustadas face a desencadeantes como infeção, autoimunidade ou malignidade.

A LHH secundária pode, de fato, manifestar-se em qualquer idade, sendo que aproximadamente 40% dos casos ocorrem em adultos, encontrando-se a média de idades aquando do diagnóstico entre os 40 e os 50 anos. Nesta faixa etária a doença está associada num maior número de casos a doenças hemato-oncológicas.⁴⁴

Infeções

As infeções são, como referido anteriormente, um dos *triggers* mais prevalentes em doentes com LHH, quer na variante primária, genética, quer na forma adquirida da doença. De entre os agentes virais, os mais frequentes, estão descritos casos de LHH secundária a EBV, CMV, HSV, HHV-8, Varicela Zoster, Influenza H1N1 e HIV, isolados ou em combinação.⁴⁵ Embora menos frequentes as infeções bacterianas, designadamente por *Mycobacterium tuberculosis* e *Brucella*, parasitárias, por *Leishmania* e *Plasmodium*, e fúngicas podem igualmente desencadear a doença.⁴⁶

A LHH induzida por infeção é especialmente prevalente em doentes com imunodeficiências primárias ou secundárias, incluindo HIV, imunossupressão iatrogénica por corticoterapia, quimioterapia ou após transplante hepático, renal ou de células progenitoras hematopoiéticas.⁴⁷ Numa revisão de 162 casos de adultos com LHH, levada a cabo por Janka et al (2014), 45% dos doentes apresentam imunodeficiência secundária, incluindo infeção por HIV ou imunossupressão terapêutica.⁴⁸

Transversalmente a todos os estudos descritos na literatura, o EBV corresponde ao *trigger* infeccioso mais prevalente, quer em idade pediátrica quer nos adultos.

A LHH induzida por EBV evolui em três fases, relacionadas com as interações vírus-hospedeiro: a primeira fase, ou fase de resposta imunitária inata, que decorre geralmente na primeira semana após infeção, traduz-se por manifestações inespecíficas

respiratórias superiores, sem alterações laboratoriais ou histológicas significativas. O aspirado medular pode apresentar hiperplasia mielóide e discreta infiltração linfóide, não sendo usualmente detetadas infiltração macrofagocitária ou hemofagocitose. A segunda fase, ou fase de ativação linfocítica T, corresponde ao desenvolvimento de hepatoesplenomegália, icterícia, alterações enzimáticas hepáticas e citopénias. No aspirado medular pode ser detetada intensa infiltração por linfócitos T citotóxicos, morfológicamente atípicos, a maioria contendo genoma de EBV, moderada infiltração macrofagocitária e hemofagocitose ocasional. Nesta fase, a hipercitocinémia é preponderante. A terceira fase, ou fase de ativação macrofagocitária, caracteriza-se por alterações no metabolismo lipídico, com hiperlipidémia, hiperferritinémia, agravamento das citopénias, supressão hematopoiética, com intensa infiltração medular por macrófagos fagocíticos e diminuição da infiltração por linfócitos T. Nesta fase, ocorre progressiva depleção de linfócitos ativados nos tecidos linfóides. Contudo, num número não quantificado dos casos a doença pode recidivar ou progredir para ativação linfocítica crónica, com linfoproliferação T clonal.^{49,50}

Tipicamente, o vírus EBV infeta os linfócitos B, desencadeando uma resposta T citotóxica ou mononucleose infecciosa, todavia, de forma inesperada, nos doentes com LHH induzida por EBV tem sido demonstrada infeção preferencial de linfócitos T CD8⁺. Uma vez infetados, os linfócitos T CD8⁺ aumentam drasticamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias, designadamente TNF- α e IFN- γ , o que resulta em recrutamento e ativação macrofagocitária e amplificação da resposta imune. De facto, a ação preponderante do TNF- α , em combinação com IFN- γ , enquanto ativador macrofagocitário, após infeção por vírus da família herpes é amplamente conhecida.^{49,50}

Lay et al (1997) demonstraram, *in vitro*, a capacidade de culturas de células T infetadas por EBV aumentarem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que uma vez em contato com culturas de monócitos provocavam a sua ativação.⁵¹

A forma como o EBV interfere com o controlo transcricional celular T, promovendo a sobre-regulação de genes codificantes de citocinas tem sido alvo de intenso estudo, considerando-se a proteína viral LMP-1 a principal envolvida neste processo. Efetivamente, a infeção de linfócitos T pelo EBV está associada à expressão das proteínas virais LMP-1, LMP-2 e EBNA-1. Chuang et al (2005) e Lay et al (1997) verificaram ser a LMP-1 que seletivamente aumenta a expressão de TNF- α em linfócitos T, apresentando uma ação negligenciável noutros tipos celulares como linfócitos B.^{50,51,52}

Segundo Chuang et al (2007), a LMP-1, proteína membranar latente tipo 1 viral, atua como elemento da superfamília TNFR, recrutando fatores associados, designados TRAF, que ativam a via NF- κ B, promovem a transcrição génica de TNF- α e IFN- γ . Simultaneamente, a LMP-1 diminui a expressão da proteína SAP, que regula negativamente a proteína SLAM, bloqueando a ativação linfocítica T. Assim, à semelhança do que ocorre na Síndrome Linfoproliferativa ligada ao X tipo 1, em que existem mutações génicas que se traduzem em disfunção da SAP, a supressão da expressão desta proteína nos linfócitos T infetados por EBV, leva à ativação desregulada e exagerada produção de citocinas.⁴⁹ (figura 4)

Por outro lado, os linfócitos T infetados, expressando LMP-1, parecem apresentar maior resistência contra os estímulos apoptóticos induzidos pelo TNF- α , sobrevivendo e proliferando, o que justifica que, ao contrário do que ocorre noutras etiologias secundárias da LHH, em que o final da fase ativa da doença corresponde à eliminação progressiva dos linfócitos T ativados, na LHH induzida por EBV a doença pode progredir para proliferação crónica.

De facto, Chuang et al (2007) comparando células T controlo com células T infetadas por EBV, verificaram que as últimas se tornavam resistente à apoptose, através da supressão da expressão do recetor TNFR-1, sensível ao TNF- α , e que na sua presença inicia a cascata das caspases culminado na morte celular programada. Assim, nestas células o bloqueio do complexo TNF- α /TNFR-1 inibe significativamente o citocromo C e as caspases 3, 8 e 9, permitindo a sobrevivência celular.⁴

Em suma, a expressão da proteína viral LMP-1 nos linfócitos T infetados desencadeia um conjunto de estratégias moleculares que confluem para a proliferação indiscriminada, e perpetuação da resposta imunitária desajustada que se verifica na LHH.

(figura 2)

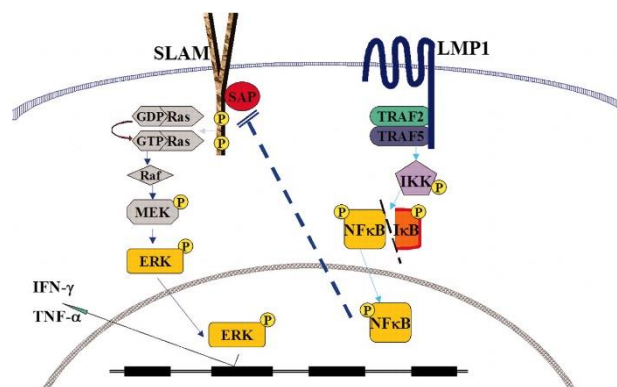


Fig. 2– Mecanismo de ação do EBV sob os linfócitos T mediado pela expressão da LMP1 (Chang et al, 2005)

Doenças malignas

A LHH no contexto de doença maligna pode ocorrer como manifestação inaugural ou subsequente da doença ou após quimioterapia, associada à imunossupressão iatrogénica e consequente suscetibilidade aumentada para infeções.

Embora a fisiopatologia não seja totalmente conhecida, o estudo de linhagens de células malignas, designadamente de linfomas, sugere que a secreção intensa de citocinas como Il-6 e INF- γ pelas células tumorais desencadeia e perpetua o estado hiperinflamatório que propicia o desenvolvimento da doença.

Segundo Ramos-Casals et al (2014), nos doentes adultos com LHH secundária a malignidade, 35% correspondem a Linfomas de células T e NK, 32% a Linfomas de células B, 6% a Leucemias, 6% a Linfomas de Hodgkin, sem preponderância de nenhum subtipo específico, 3% a tumores sólidos, essencialmente tumores mediastínicos de células estaminais, e 17% a outros.⁵²

Nos países ocidentais e Japão, o Linfoma Difuso de Grandes Células B parece ser o mais prevalente em adultos com manifestações de LHH, particularmente após os 60 anos de idade, enquanto na China e Coreia, os estudos mostram ser as neoplasias de células T^{18,53}

Machaczka et al (2011) estimam que aproximadamente 0.9% de todos os adultos com doença hemato-oncológica apresentem como complicação LHH, constituindo a sua manifestação um índice independente de pior prognóstico, particularmente em doentes com linfomas de células T e NK.⁵⁴ Sano et al (2014) verificaram que a mortalidade precoce a 4 meses em doentes com LHH secundária era significativamente superior nos doentes que apresentavam linfoma NK e T (62.5%) do que nos com linfoma de células B (10.5%).⁵⁵ Em doentes pediátricos, as neoplasias de células T são os mais frequentes, incluindo Linfomas T Periféricos, particularmente tipo paniculite, Linfomas $\gamma\delta$ -T Cutâneos Primários, Linfomas Anaplásicos de Células Grandes e, num menor número de casos, Linfomas Linfoblásticos.^{56,57}

Importa salientar que neste grupo de doentes as infeções virais, principalmente por EBV, podem atuar como *co-triggers*. A prevalência de EBV como *co-trigger* é estimada por Menard et al (2008) e Chang et al (2009) em aproximadamente 90% nos Linfomas de Hodgkin e 33% nos Linfomas T Periféricos^{58,59}, sendo francamente baixa nos Linfomas Difusos de Grandes Células B.⁶⁰

Relativamente aos doentes sujeitos a quimioterapia, o risco de desenvolver LHH parece igualmente ser superior nas doenças hemato-oncológicas, podendo manifestar-se na fase de indução, consolidação ou manutenção. A prevalência de infeção nestes doentes varia entre 75% a 100%, sendo que, ao contrário do que ocorre nos indivíduos imunocompetentes em que os principais *triggers* infecciosos são agentes virais, as bactérias e fungos desempenham uma ação patogénica substancial.^{61,62}

Interessante ainda notar os casos descritos na literatura de doentes com neoplasias malignas secundárias ao tratamento para LHH, o que se pensa dever às elevadas doses cumulativas de inibidores da topoisomerase, designadamente, Etoposido.⁶³

De facto, o diagnóstico de LHH no contexto de doença hemato-oncológica pode ser bastante desafiante uma vez que as manifestações características, como febre, citopénias, organomegalias e elevação dos marcadores inflamatórios são comuns às duas entidades, podendo ser encontradas em doentes com neoplasias hematológicas, quer apresentem HLL secundária, quer não.

Doenças autoimunes

A LHH induzida por doença autoimune é usualmente designada por Síndrome de Ativação Macrofágica (SAM), podendo manifestar-se em idade pediátrica ou na fase adulta, aquando da apresentação da doença, durante as fases ativas ou no curso do tratamento; ou em associação com infeção, particularmente nos doentes submetidos a terapêutica com agentes anti-TNF- α .⁶⁴

Diversas doenças reumatológicas autoimunes foram associadas à SAM, incluindo Artrite Idiopática Juvenil Sistémica (AIJS), a mais prevalente, Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), Artrite Reumatoide (AR), Dermatomiosite/Polimiosite, Esclerose Sistémica, Doença Mista do Tecido Conjuntivo, Doença de Still, Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos, Síndrome de Sjögren, Espondilite Anquilosante, Vasculites e Sarcoidose.⁶⁵

A prevalência de SAM como complicação potencialmente fatal nos doentes com patologia autoimune não é inteiramente conhecida, sendo estimada em 0.9% a 4% nos doentes com LES, 12% na doença de Still e aproximadamente 10% nos doentes com AIJS.⁶⁶ Contudo, estudos recentes mostram que a síndrome se pode manifestar de forma subclínica em até 30 a 40% dos doentes com AIJS.⁶⁷

A SAM, à semelhança do que ocorre nas restantes variantes da LHH, caracteriza-se por uma resposta imunitária exagerada, mas ineficaz, com excessiva ativação de células T, NK e macrófagos, e hipersecreção de citocinas pró-inflamatórias.

Embora os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta síndrome não se encontrem inteiramente esclarecidos, estudos revelam a existência de uma predisposição genética semelhante à descrita nos casos de LHF, traduzindo-se em defeitos na função

citotóxica de células NK indistinguíveis dos encontrados na referida variante familiar da doença.⁶⁸

Fukaya et al (2008) corroboram esta evidência, identificando mutações heterozigóticas em genes relacionados com LHF, designadamente PRF1 e UNC13D, em jovens com AIJS, com manifestações de SAM. Do mesmo modo, a AIJS parece distinguir-se das restantes formas de artrite juvenil por contagens mais baixas de NK, funcionalmente débeis, e menor expressão de perforina.⁶⁹

À semelhança do que acontece na LHH secundária a doenças malignas, as características clínicas e laboratoriais da SAM podem ser sobreponíveis às encontradas na fase ativa da doença autoimune ou decorrentes de efeitos adversos da terapêutica, mesmo na ausência de SAM, o que dificulta o diagnóstico precoce, que previna lesões orgânicas irreversíveis mediadas pela hipercitocinémia.

MANIFESTAÇÕES DA SÍNDROME

Manifestações Clínicas

A LHH pode ter um largo espectro de apresentações clínicas que incluem febre sem foco, hepatite/falência hepática aguda, sépsis-like, Kawasaki-like ou neurológicas. O aparecimento súbito e inexplicável de sinais e sintomas compatíveis com uma resposta inflamatória sistémica deve obrigar sempre à exclusão da doença como hipótese diagnóstica.

As manifestações clínicas mais frequentes incluem febre, hepatomegália, esplenomegália, adenomegalias múltiplas, *rash* e alterações neurológicas. No estudo HLH-94, um dos estudos prospetivos com maior coorte até à data, 249 doentes em idade pediátrica, foi possível identificar febre em aproximadamente 97%, hepatomegália em 95%, adenomegalias e alterações neurológicas em 35% e *rash* em 31% dos doentes.⁷⁰

Estes valores são semelhantes aos descritos pelo *FHL Study Group of the Histiocyte Society*, tendo em conta 122 casos pediátricos presentes no Registo Internacional Europeu. Neste estudo foi possível ainda identificar esplenomegália em 97% dos doentes.⁷¹

Na faixa etária adulta as manifestações clínicas predominantes parecem ser as mesmas, apresentando todavia prevalências distintas. Ramos-casals et al (2014), no seu estudo retrospectivo com uma coorte de 775 adultos com LHH, identificaram febre em 96%, esplenomegália em 69% e hepatomegália em 67% dos doentes.⁵²

A **febre**, resultante da libertação descontrolada e persistente de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , prolonga-se geralmente por mais de 7 dias.

Palazzi et al(2003), realizando uma revisão retrospectiva de 17 casos de doentes pediátricos com evidência de febre sem causa aparente, constataram que nos doentes diagnosticados com LHH a febre persistia em média 19 dias (variando de 4 a 41 dias).⁷²

No período neonatal, contudo, é comum não existir febre, o que não deve excluir a doença como hipótese de diagnóstico.⁷³

A **hepatoesplenomegália** nestes doentes justifica-se pela infiltração dos tecidos reticulo-epiteliais pelos linfócitos e macrófagos ativados, visível em biopsia. De fato, a maioria dos doentes evidencia sinais ligeiros a fulminantes de hepatite aguda, com elevação das transaminases e/ou hiperbilirrubinemia. Foi possível identificar elevações das enzimas hepáticas até 3 vezes os valores normais em 50 a 90% dos doentes com LHH. Em até 25% dos doentes após transplante de células hematopoiéticas foi descrita doença veno-oclusiva hepática.⁷⁴⁻⁷⁶

A **hipoalbuminemia** é também uma manifestação comum da doença particularmente em adultos, faixa etária onde pode apresentar até 95% de prevalência, correspondendo a um fator de mau prognóstico.⁷⁷

Mais de um terço dos doentes em idade pediátrica e até 25% dos doentes adultos apresentam **sinais ou sintomas neurológicos**, variáveis quanto à gravidade, como convulsões, alterações do nível de consciência (associadas a encefalite), meningismo, irritabilidade, atraso no desenvolvimento psicomotor, ataxia, hipotonia e parésia dos nervos cranianos. Foram também descritas neuropatia periférica desmielinizante difusa, dor e fraqueza muscular nestes doentes⁷⁸⁻⁸⁰

De Armas et el (2004) descreveram o caso de um rapaz de 11 anos, com história familiar de consanguinidade, diagnosticado com polirradiculoneuropatia difusa associada a sintomas digestivos e infecção por EBV, no contexto de LHH. Os autores referidos sugerem que a neuropatia periférica em doentes com LHH seja secundária à destruição da mielina pelos macrófagos ativados⁸¹

A LHH parece ainda estar associada a um risco aumentado de Síndrome de Encefalopatia Posterior Reversível. Esta síndrome clinico-radiológica, descrita em adultos e crianças, caracteriza-se por cefaleias, convulsões, sintomas focais e alterações visuais, com hemorragias retinianas, edema do nervo ótico e infiltração dos plexos coroídeos. As imagens de RM contribuem para o diagnóstico, sendo característico edema cerebral bilateral vasogénico afetando preferencialmente os territórios vasculares posteriores. As manifestações clínicas e alterações radiológicas são completamente reversíveis quando corrigida atempadamente a causa subjacente.⁸¹

Não raras vezes as manifestações neurológicas dominam o quadro clínico nos doentes com LHH, podendo surgir antes ou aquando dos restantes sinais e sintomas característicos.

O LCR apresenta-se alterado em mais de 50% dos doentes, sendo frequentes achados como pleiocitose, proteinorráquia e hemofagocitose. A pleiocitose representa um fator independente de mau prognóstico em idade pediátrica, sendo menos vezes descrita em adultos.⁷⁸⁻⁸⁰

As imagens de ressonância magnética em doentes com LHH podem variar desde lesões discretas, à presença de zonas hipodensas e necróticas, reforço leptomeníngeo difuso ou edema generalizado.⁷⁸⁻⁸⁰

Outras manifestações incluem **alterações cutâneas**, variáveis e heterogéneas, como *rash* eritematoso maculopapular generalizado, eritrodermia, edema, paniculite, petéquias ou púrpura. Alguns doentes podem apresentar outras manifestações sugestivas de Kawasaki, designadamente, adenopatias cervicais, conjuntivite e eritema da mucosa oral.⁷

Ramos-casals et al (2014) descreveram alterações cutâneas em 25% dos adultos com LHH, valor ligeiramente inferior ao descrito para a população pediátrica.⁵²

Os doentes podem igualmente apresentar **alterações respiratórias** similares à síndrome de dificuldade respiratória aguda, com hipoxémia, condensação alvéolo-intersticial e derrame pleural na radiografia torácica. Além disso, as infeções respiratórias correspondem a um importante *trigger* de LHH secundária, pelo que deve ser sempre excluída a presença de processo infeccioso ativo. Fitzgerald e MacClain_(2003) avaliaram a repercussão imagiológica da LHH em 25 doentes, tendo encontrado em 17 opacidades bronco-alveolares e derrame pleural.⁸²

Ramos-casals et al (2014) relataram envolvimento respiratório em 42% dos casos.⁵²

Em até 16% dos adultos com a doença foram identificadas **manifestações renais** como hiponatrémia, presumivelmente por um mecanismo SIADH. Numa percentagem não qualificada dos casos a doença pode evoluir para insuficiência renal crónica, com necessidade de terapêutica de substituição renal.

Foram ainda descritas incidências aumentadas de **hemorragia** aguda nestes doentes, o que se justifica pela falência do sistema de coagulação, induzida pela insuficiência hepática, trombocitopénia e, em algumas variantes da doença, alterações da função plaquetária, e **hipotensão**.⁷

Nos doentes com mutações no gene STXBP2, aproximadamente 10% dos doentes com LHH familiar, às manifestações clínicas supracitadas podem acrescer **sintomas gastrointestinais**, nomeadamente diarreia crónica. Pagel et al(2012) identificaram diarreia crónica grave em 38% das 37 crianças com mutações STXBP2 incluídas no seu estudo retrospectivo. Nesses casos a diarreia não respondia ao tratamento para a LHH, mesmo quando ocorria melhoria da restante sintomatologia.⁸³

De facto, o gene STXBP2, e a proteína Munc 18-2 que codifica, desempenham um papel preponderante na libertação de grânulos secretórios não só nas células T e NK (ver fisiopatologia), como também nas plaquetas e neutrófilos. A evidência mostra que a libertação dos componentes dos grânulos neutrofílicos, ricos em protease, no fagossoma em mobilização é fundamental para o controlo de infeções bacterianas e fúngicas. Assim, segundo Zhao et al (2013), nos doentes com mutações STXBP2 o compromisso da função granulocítica poderá justificar as manifestações de diarreia crónica.⁸⁴

Alterações Laboratoriais e Imunológicas

As alterações laboratoriais mais frequentes em doentes com LHH incluem citopénias, hiperferritinémia, hipertrigliceridémia, hipofibrinogénemia, alterações enzimáticas hepáticas e da coagulação, elevação da LDH, hipoproteinémia, hiponatrémia, valor aumentado de VLDL e diminuído de HDL.

A análise do sangue periférico nestes doentes revela frequentemente contagem diferencial de células T com um ratio CD4⁺/CD8⁺ normal, contagem de linfócitos B diminuída e níveis de imunoglobulinas variáveis.⁸⁵

Outras alterações imunológicas compreendem níveis aumentados de CD25 solúvel (fracção alfa do recetor IL-2 solúvel) e CD163 solúvel, e atividade diminuída ou abolida de células NK. Nas formas primárias da doença a expressão superficial de perforina, XIAP ou SAP encontram-se diminuídas na citometria de fluxo, consoante se trate de LHH familiar tipo 2, síndrome linfoproliferativa tipo 1 ou tipo 2, respetivamente.⁸⁶

Em mais de 80% dos doentes com LHH é possível identificar à data do diagnóstico **citopénias** em pelo menos duas das três linhagens hematopoiéticas, o que se pode explicar pela hemofagocitose direta e pelas concentrações elevadas de TNF- α e IFN- γ , que suprimem a hematopoiese. Mais frequentemente os doentes apresentam anemia (Hb <9mg/dl) e/ou trombocitopenia (plaquetas <100x10⁹/l).⁷

A **hiperferritinémia** é um achado comum nos doentes com LHH. No estudo HLH-94, por Henter et al (1997), foram encontrados valores de ferritina > 500 ng/ml em mais de 90% dos doentes, sendo que aproximadamente 25% apresentavam valores > 10000 ng/ml. O valor médio de ferritina encontrado foi 2950 ng/ml. Considerando um *cutoff* de 500 ng/ml, a especificidade da ferritina enquanto critério de diagnóstico foi estimada em 84%.⁴ Estudos subsequentes demonstraram que um valor de *cutoff* mais elevado, 10000 ng/ml, apresentava uma sensibilidade de 90% e especificidade superior de 96% para LHH, em idade pediátrica.⁸⁷ De fato, estes estudos foram conduzidos em crianças e adolescentes, sendo os resultados extrapolados para a população adulta, contudo a evidência aponta para que este seja um critério de reduzida especificidade nesta faixa etária. Moore et al (2013), considerando uma amostra de 627 adultos com valores de ferritina sérica >1000 ng/ml, verificaram que apenas 1% apresentava LHH.⁸⁸ Resultados corroborados pelo estudo de Scrham et al (2015) que de entre 163 adultos com ferritina >10000 ng/ml apenas diagnosticaram LHH em 19% dos casos.⁸⁹ Embora descrevendo frequências diferentes de acordo com o *cutoff* considerado, ambos os estudos evidenciam que enquanto nas crianças valores elevados de ferritina apresentam especificidade elevada para a doença, nos adultos não existe um valor a partir do qual a hiperferritinémia seja específica, dado que pode estar associada a diversas outras patologias mais frequentes, como insuficiência renal, lesão hepatocelular, infecção, doenças hematológicas, doença reumatológicas, anemias hemolíticas e sobrecarga de ferro.

Nos doentes com LHH secundária, estudos recentes mostram que uma percentagem reduzida de ferritina glicosilada na presença de valores totais elevados de ferritina, pode ser um marcador de diagnóstico precoce mais específico para a doença.^{90,91}

Ressalte-se que valores baixos de ferritina (<500 ng/ml) não excluem o diagnóstico, uma vez que podem ocasionalmente ser encontrados, particularmente nas formas genéticas da doença.

Nestes doentes a hiperferritinémia, marcador de inflamação generalizada, parece dever-se à ação macrofagocitária hiperativa mediada pelo recetor CD163, responsável pela clearance dos complexos haptoglobina-hemoglobina, com libertação de ferro.

A **hipertrigliceridémia**, observada em até 70% dos doentes com LHH e 40% dos doentes com LHH adquirida, parece ser secundária à atividade diminuída da lipase lipoproteica, induzida por níveis elevados de TNF- α .⁷

A **hipofibrinogenémia** é também uma manifestação frequente nestes doentes. Os seus mecanismos fisiopatológicos são complexos e não inteiramente conhecidos. A

evidência mostra que os valores baixos de fibrinogénio resultam de hiperfibrinólise direta, estimulada pelo fator ativador do plasminogénio, secretado pelos macrófagos em resposta à libertação de citocinas, nomeadamente IL-1 e TNF- α pelos linfócitos ativados, o que resulta no aumento dos níveis de plasmina e consequente degradação do fibrinogénio. A elevada incidência de **coagulação intravascular disseminada (CID)**, representa um processo de hiperfibrinólise secundária que contribui também para os níveis baixos de fibrinogénio.⁷

A CID nestes doentes está associada à elevada e persistente concentração de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente TNF- α , que apresenta atividade pró-coagulante, estimulando a ativação plaquetária e do sistema de coagulação, com consequente formação e deposição de fibrina, trombose microvascular e lesões parenquimatosas isquémicas múltiplas. A evolução da CID resulta no consumo excessivo de plaquetas e fatores de coagulação e, paradoxalmente, tendência hemorrágica. Os níveis dos **produtos de degradação da fibrina**, particularmente D-dímeros, apresentam-se francamente aumentados. Contudo, foram descritos casos de CID em doentes com LHH sem elevação dos D-dímeros, o que se pensa dever-se à sua fagocitose pelos macrófagos hiperativados do sistema reticuloendotelial.⁷

As perturbações da coagulação são mais frequentes em doentes com LHH relacionada com doenças hemato-oncológicas comparativamente à LHH associada a infeções, o que pode em parte ser justificado pela infiltração hepática por células neoplásicas, com agravamento da função da coagulação hepática.⁹²

Estima-se que até 95% dos doentes apresentem algum grau de coagulopatia.

A **LDH** encontra-se aumentada em até 85 % dos doentes adultos e em idade pediátrica. Valor de LDH >1000U/L em doentes com outras manifestações clínicas e laboratoriais da doença apoia o diagnóstico de LHH associada a linfoma.⁹³

A hiperativação e proliferação de linfócitos T característica da LHH traduz-se em níveis elevados de **recetor IL-2 solúvel**, superiores a 2400 μ /ml em aproximadamente 100% dos doentes, sendo este o marcador diagnóstico que se parece melhor correlacionar com a atividade da doença.⁹⁴

Em idade pediátrica, os níveis aumentados de recetor IL-2 solúvel apresentam sensibilidade estimada de 93% enquanto critério de diagnóstico. Nos adultos a sensibilidade é estimada em 90% e a especificidade em 77%.⁹⁵

A IL-2 é uma linfocina produzida por linfócitos T *helper* e em menor quantidade por linfócitos T citotóxicos, quando sensibilizados por estímulos antigénicos através da

ligação MHC II - TCR. Desempenha uma ação autócrina e parócrina fulcral na proliferação e crescimento celular T, B e na ativação de células NK e monócitos, iniciando a ativação de uma cascata de citocinas com efeitos sinérgicos e inibitórios da sua própria atividade na resposta imunitária. Uma vez sensibilizados pelas células apresentadoras de antígeno, os linfócitos T iniciam a produção e secreção de IL-2 e a expressão membranar do seu recetor, permitindo um mecanismo de autoestimulação que favorece a divisão celular. O recetor IL-2 apresenta três subunidades proteicas (α , β , μ) que uma vez associadas não covalentemente permitem uma ligação de alta afinidade à IL-2 e a internalização do complexo IL2 - IL2R, com consequente sinalização nuclear e aumento da produção de IL-2 e de fatores de transcrição fundamentais para a replicação celular. Quando a estimulação antigénica é interrompida a expressão de recetor diminui e a fase proliferativa termina. Rubin (1985) descreveu pela primeira vez uma forma de IL-2R α solúvel (sIL-2R) no plasma, secretada por células T e B sensibilizadas.⁹⁶ Esta forma foi encontrada em culturas de linfócitos normalmente ativados, bem como em doenças hemato-oncológicas de células B e T, doenças inflamatórias incluindo LHH, autoimunes, rejeição de transplante de órgãos e processos infecciosos específicos, podendo ser considerado um marcador de ativação imunológica.

O **rácio sIL-2R/ferritina** tem sido descrito por diversos autores como marcador diagnóstico precoce fidedigno em adultos com LHH, particularmente associada a linfoma, apresentando uma sensibilidade estimada de 85% e especificidade de 91% nesta faixa etária. Takahiro et al (2014) identificaram diferenças estatisticamente significativas no ratio sIL-2R/ferritina em doentes com LHH relacionada com linfoma, quando comparados com doentes com LHH associada a outras etiologias. Em média, no primeiro grupo o *rácio* era 8.56, muito superior ao do segundo grupo, onde era 0.66.⁹⁷

A **atividade das células NK** em doentes pediátricos com LHH encontra-se frequentemente diminuída ou abolida, podendo ser avaliada através de testes funcionais de desgranulação que avaliam a expressão superficial de CD107a ou de ensaios com libertação de crómio. Resultados destes testes inferiores a 5% têm sido reportados como tendo uma sensibilidade de 96% e especificidade de 88% em crianças com a variante familiar da doença.⁹⁸

Nos adultos a correlação entre a defeitos função NK e a doença não parece ser tão linear, sendo os estudos contraditórios quanto à sua prevalência, variando entre 36% e 67% dos doentes.⁹⁹ É Interessante notar a reduzida percentagem de doentes adultos em que a avaliação da função NK foi realizada nestes estudos, apenas 8 a 15% dos casos.

A CD107a é uma proteína lisossômica constituinte dos grânulos líticos de linfócitos T citotóxicos e células NK . A exocitose destes grânulos, após estimulação celular, reflete-se na presença de CD107a na superfície membranar. Assim, a expressão de CD107a constitui um importante marcador da capacidade de desgranulação e consequentemente citotoxicidade de células NK e linfócitos T, potencialmente útil no diagnóstico diferencial das formas primárias de LHH. Bryceson et al (2012) avaliaram o desempenho dos testes de desgranulação baseados na expressão de CD107a por citometria de fluxo, numa coorte de 468 pacientes com suspeita de LHH, tendo verificado que estes apresentavam alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LHH familiar.¹⁰⁰

Na verdade, a análise de marcadores superficiais por citometria de fluxo parece permite um diagnóstico precoce seguro, dirigindo a terapêutica até ao diagnóstico molecular definitivo, mais moroso, em doentes com variantes genéticas de LHH.

Assim, além da expressão superficial de CD107a é possível avaliar a expressão de perforina, XIAP e SAP, uteis no diagnóstico de LHH familiar tipo 2 e associada às Síndromes Linfoproliferativas tipo 1 e 2, respetivamente.

O recetor **CD163** é um recetor regulador de fase aguda, exclusivamente expresso em macrófagos e monócitos, envolvido na endocitose e clearance de complexos haptoglobina/hemoglobina, e que se considera desempenhar uma ação protetora contra o dano oxidativo celular mediado pela hemoglobina livre. A ativação macrofagocitária descontrolada característica da LHH conduz a níveis aumentados de CD163 solúvel no plasma.⁸⁶

O doseamento das citocinas **CXCL10** e **CXCL9** tem igualmente sido estudado como marcador diagnóstico precoce para LHH induzida por linfoma.¹⁰¹

Alterações Histológicas

Histologicamente, a doença caracteriza-se pela acumulação disseminada de linfócitos e macrófagos maduros, com ou sem hemofagocitose, na medula óssea, baço, gânglios linfáticos, fígado e LCR.

No fígado são comuns imagens histológicas semelhantes às encontradas na hepatite crónica, ricas em infiltrados linfo-macrofagocitários periportais.¹⁰²

A medula óssea pode apresentar normo, hipo ou hiper celularidade, sendo a infiltração medular por macrófagos ativados consistente com HLL, não apresentando estes a atipia celular característica das histiocitoses malignas. A coloração da medula

óssea para o recetor CD163 facilita a visualização microscópica dos macrófagos em biópsia medular.⁸⁶

A prevalência de hemofagocitose medular em doentes com LHH varia entre 25 a 100%, podendo não estar presente aquando da manifestação inaugural da doença. Em alguns doentes a hemofagocitose manifesta-se apenas em fases avançadas ou quando já existe melhoria sintomatológica. A hemofagocitose é um critério de diagnóstico com baixa especificidade e sensibilidade no contexto de LHH, pelo que a sua ausência não deve excluir ou atrasar o diagnóstico da doença.¹⁰³. Risdall et al (1979) estimam uma especificidade de 60%¹⁰⁴. Neste estudo foi possível identificar frequências elevadas de hemofagocitose nos casos de controlo, que não cumpriam critérios de diagnóstico para LHH, o que corrobora a evidência de que diversas outras etiologias como infeções, transfusões sanguíneas, doenças autoimunes, anemias hemolíticas, síndromes de falência medular e terapêutica com agentes citotóxicos podem igualmente desencadear hemofagocitose medular.

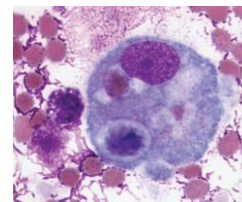


Fig. 3- Hemofagocitose no mielograma. (Rosado et al, 2014)

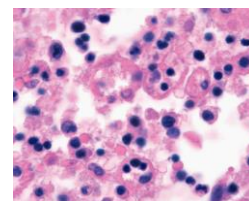


Fig. 4- Hemofagocitose na biópsia medular. (Rosado et al, 2014)

Salienta-se que a principal etiologia associada a hemofagocitose em adultos, quer cumpram ou não critérios de diagnóstico para LHH, são as doenças hematológicas, com importante destaque para os Linfomas não-Hodgkin de células T, NK e células B. Em dois grandes estudos retrospectivos com 264 e 312 doentes com hemofagocitose medular mais de 50% dos casos apresentavam doença hematológica.^{105,106}

Importa ainda referir que nos casos em que não seja possível identificar hemofagocitose nas amostras medulares, e em que persistam dúvidas no diagnóstico, podem ser colhidas amostras de outros órgãos, mormente através de biópsia hepática ou ganglionar, na presença de adenopatias.¹⁰²

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de Linfohistiocitose Hemofagocítica é ainda complexo e muitas vezes tardio, particularmente na forma secundária, o que se justifica pela raridade da doença, a complexidade dos critérios de diagnóstico, a variabilidade e heterogeneidade das manifestações clínicas e laboratoriais e reduzida especificidade das mesmas.

O diagnóstico é primariamente clínico, e embora os sinais e sintomas possam ser sobreponíveis a uma grande variedade de patologias, devem ser avaliados tendo em

conta o padrão, e corroborados por dados laboratoriais, histológicos, imunológicos, genéticos e outros métodos complementares de diagnóstico adequados.

A avaliação inicial do doente com suspeita de LHH, independentemente da faixa etária, deve visar o diagnóstico das possíveis etiologias, bem como das mutações genéticas associadas às variantes primárias da doença. Assim, a marcha diagnóstica deve incluir: ^{4,102}

1. **Anamnese:** história pessoal de episódios sintomatológicos semelhantes, febre > 7 dias, infecções recentes, imunossupressão (HIV ou terapêutica), doenças malignas, autoimunes ou outras conhecidas; história familiar de consanguinidade parental ou de LHH.
2. **Exame físico:** sinais vitais, pesquisa de adenomegalias, hepatomegália, esplenomegália, ascite, sinais de hemorragia ativa, alterações cutâneas ou alterações neurológicas.
3. **Estudo analítico:** hemograma com contagem leucocitária diferencial e plaquetas, contagem de reticulócitos, ferritina, perfil hepático (AST, ALT, GGT, albumina, bilirrubina total), coagulação (APTT, TP, Fibrinogénio, D-dímeros), VS, LDH, triglicéridos, função renal (creatinina), TFG (ajuste terapêutico caso necessário) e ionograma. Eletroforese de proteínas e eventual imunofixação sérica e urinária. CD25 solúvel e CD163 solúvel. Punção lombar (estudo citoquímico e imunofenotipagem, microbiológico e citológico)
4. **Despiste de doenças infecciosas/inflamatórias:** EBV (serologia e PCR carga viral), CMV (serologia e PCR carga viral), HIV 1 e 2, VHB, VHC, Rubéola, Varicela, Parvovírus, *Mycoplasma spp.*. Hemoculturas (aerobiose, micológico e micobacteriano). Nos casos de alta suspeição IGRA, Malária, *Leishmania spp.*, VDRL, Brucelose.
ANA, Anti-dSDNA, Anti-ENA, Anti-Scl70, Anti-CCP, Anticoagulante lúpico, Anti-cardiolipina, Anti-β2 glicoproteína 1
5. **Estudo imagiológico:** Rx tórax, TC pescoço, torácico, abdominal e pélvico, RM crânio-encefálica. Em casos específicos ponderar PET.
6. **Biópsia Óssea e Aspirado Medular (com Imunofenotipagem)**

A avaliação diagnóstica pode ainda ser complementada, particularmente em idade pediátrica, quando existe suspeita de LHF ou associada a outras síndromes de imunodeficiência primária por estudo do sangue periférico através de citometria de fluxo e testes moleculares. A evidência recente apoia a sua realização também nos adultos, uma

vez que a prevalência de mutações, designadamente heterozigóticas, tem sido descrita de forma crescente nesta faixa etária, quer nos doentes com manifestações tardias de variantes primárias da doença, quer nos casos de LHH secundária. Contudo, os custos elevados e inacessibilidade em alguns hospitais dificulta a sua realização por rotina.

1. **Avaliação do sangue periférico por citometria de fluxo:** função/desgranulação de células NK através da expressão superficial de CD107a, expressão de perforina, granzima B, SAP e XIAP (os dois últimos apenas no sexo masculino),
2. **Testes moleculares:** possíveis alterações na citometria de fluxo devem direcionar a realização de testes genéticos, assim, a expressão diminuída de perforina, SAP ou XIAP deve implicar o despiste de mutações no gene PRF1, SH2D1A e BIRC4, respetivamente. A diminuição da expressão de CD107a deve levar ao despiste de mutações nos genes UNC13D, STX11, STXBP2 e RAB27A.

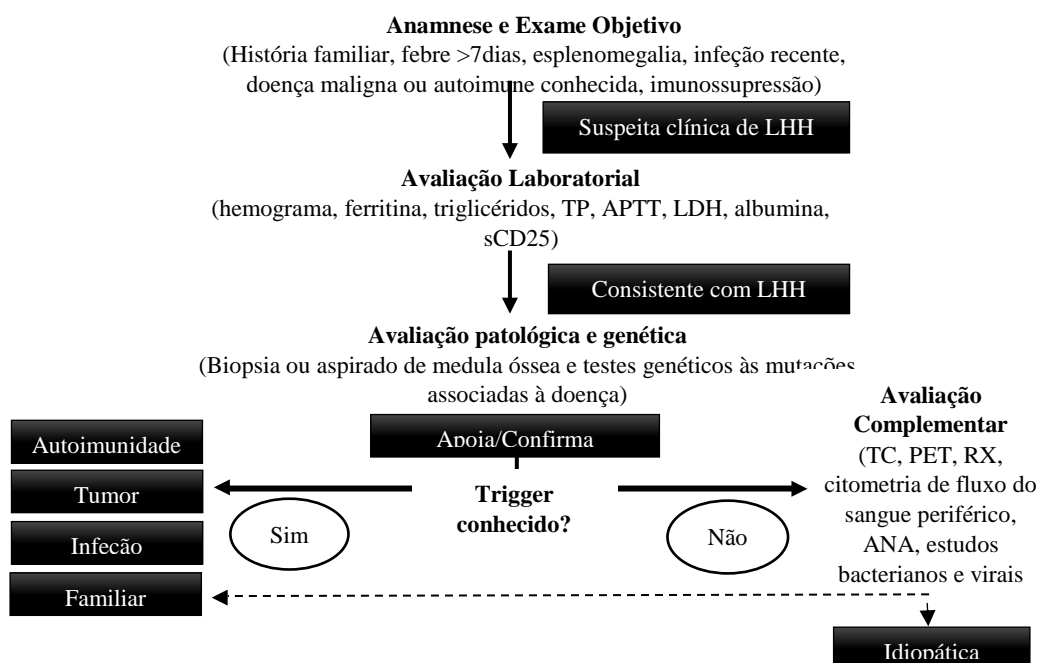


Fig. 5- Proposta de diagrama para o diagnóstico de LHH (Adaptado de Schram and Berliner, 2015)

Critérios de Diagnóstico

As primeiras guidelines para o diagnóstico de LHH surgiram em 1991, propostas pelo *FML Study Group of the Histiocyte Society*, e baseavam-se em: critérios clínicos, nomeadamente presença de febre e esplenomegalia; laboratoriais, presença de citopénias envolvendo pelo menos 2 das 3 linhagens hematopoiéticas, hipertrigliceridémia e/ou hipofibrinogénemia; e histopatológicos, hemofagocitose na medula, baço ou gânglios linfáticos, na ausência de doença maligna.

Estes critérios serviram de base para o primeiro grande estudo prospectivo relativo ao diagnóstico e tratamento da Linfohistiocitose Hemofagocítica, HLH-94, levado a cabo por Henter et al, com uma amostra de 113 pacientes, provenientes de 21 países, com idade inferior a 15 anos, que cumpriam os critérios supranomeados e/ou com um irmão tendo a doença. Tendo sido realizado um *follow-up* a 3 anos.⁴

Tendo em conta os resultados do estudo HLH-94 e a crescente evidência em relação às bases moleculares e genéticas da doença, as guidelines diagnósticas foram revistas em 2004. No protocolo HLH-2004 foram introduzidos novos critérios de diagnóstico, nomeadamente, atividade das células NK diminuída ou nula, valor de recetor IL-2 solúvel aumentado e hiperferritinémia. O diagnóstico de LHH, segundo este protocolo, poderá ser realizado na presença de pelo menos 5 dos 9 critérios mencionados, ou caso exista um diagnóstico molecular de mutações nos genes associados à variante familiar da doença, independentemente do preenchimento dos restantes critérios. Os autores destacam ainda a presença de pleiocitose no LCR e proteinorráquia, e de imagens histológicas sugestivas de hepatite crónica em biópsia, como fortes evidências corroborantes do diagnóstico. Outras manifestações clínicas e laboratoriais como adenopatias, icterícia, edema, *rash*, hipoproteinémia, valor de VLDL aumentado e de HDL diminuído e elevação das enzimas hepáticas são igualmente referidas como consistentes com a doença.¹⁰²(*figura 8*)

Embora este protocolo constitua uma importante referência a nível internacional, a LHH, primária e secundária, pode apresentar-se de forma atípica e/ou insidiosa, pelo que o não preenchimento de todos os critérios supracitados ou em fases mais tardias do curso da doença, não devem excluir o seu diagnóstico.

Do mesmo modo, a sua elaboração baseou-se em estudos com amostras reduzidas de doentes em idade pediátrica, pelo que diversas limitações têm sido apontadas relativamente à sua sensibilidade e especificidade em adultos, particularmente nos casos de LHH induzida por doença maligna ou auto-imune.

Assim, tendo em vista identificar os critérios mais sensíveis e específicos para o diagnóstico positivo de LHH em adultos, Hejblum et al (2014) realizaram uma análise Delphi baseada na aplicação de um questionário a um painel de *experts*, relativo a vinte e seis critérios relacionados com a doença. Desses, foi possível encontrar consenso em sete critérios, considerados absolutamente necessários: citopénias, hemofagocitose, hiperferritinémia, febre, organomegália, elevação da LDH e predisposição genética.

Outros considerados menos relevantes incluíam: rash, hipoalbuminémia, atividade NK, sIL-2R, CD163 solúvel e anomalias enzimáticas hepáticas.¹⁰⁷

Fardet et al (2014), de acordo com os resultados do seu estudo multicêntrico retrospectivo com uma cohort de 312 adultos (162 com hemofagocitose secundária, 104 sem a doença e 46 em que persistiam dúvidas quanto ao diagnóstico) elaboraram um *score* diagnóstico, designado *HScore*, visando estimar o risco individual de LHH secundária. O *HScore* baseiem-se em três variáveis clínicas, presença de febre, organomegália e/ou imunossupressão; cinco variáveis biológicas, hipertrigliceridémia, hiperferritinémia, hipofibrogenémia, citopénias e elevação da ALT; e uma variável citológica, presença de hemofagocitose no aspirado medular. Os autores estimam a probabilidade de apresentar a doença em < 1% se *HScore* ≤ 90 e em > 99% se *HScore* ≥ 250.¹⁰⁸

Os vários critérios alternativos ao protocolo HLH-2004 para o diagnóstico de LHH secundária em adultos propostos na literatura têm revelado pouco adesão internacional, sendo necessários estudos prospectivos que corroborem a sua validade.

CRITÉRIOS HLH 2004 PARA O DIAGNÓSTICO DE LHH		
Clínicos	Laboratoriais	Histológicos
Febre Esplenomegália	Citopénias ≥ 2 linhagens - Hb < 90 g/L - Plaquetas < 100x10 ⁹ /L - Neutrófilos < 1.0x10 ⁹ /L Triglicéridos ≥ 265mg/dl Fibrinogénio < 1.5g/L Ferritina ≥ 500mg/L sC25 ≥ 2,400 U/ml Atividade NK diminuída	Hemofagocitose na medula, baço ou gânglios linfáticos (na ausência de doença maligna)
OU diagnóstico molecular de mutações nos genes associados a LHH		

Tabela 3- Critérios de Diagnóstico HLH 2004 (Adaptado de Henter et al, 1997)

Particularidades Diagnósticas LHH/Doença Maligna

Como referido anteriormente, as manifestações características da LHH secundária podem ser sobreponíveis às encontradas durante a fase ativa das doenças auto-imunes ou no curso de doenças malignas na sua ausência, o que dificulta e, usualmente, retarda o diagnóstico. A combinação, extensão e progressão anormal e inexplicável dos sinais e sintomas deve constituir um sinal de alerta, que obrigue à exclusão de LHH como complicação destas patologias.

Do mesmo modo, em todos os doentes que cumpram critérios de diagnóstico para LHH deve ser feito o despiste de doenças malignas, particularmente hematológicas, mesmo na presença de outros *triggers* característicos como infeção ou auto-imunidade. Fardet et al (2010) identificaram neoplasias ocultas em mais de 50% dos doentes do seu estudo com LHH e HIV, maioritariamente linfoma.¹⁰⁹ Além disso, a infeção por EBV, um dos *triggers* mais prevalentes de LHH, tem sido reiteradamente associada a doenças linfoproliferativas.

A existência de predisposição genética associada às variantes primárias da doença, embora diminuído a probabilidade, não exclui igualmente a presença de doença maligna oculta, tendo inclusivamente sido descrita a associação entre mutações bialélicas no gene PRF1 e doenças hemato-oncológicas.

No contexto de doença maligna hematológica, designadamente linfoma, a tétrede trombocitopenia (plaquetas $< 40 \times 10^9$), ratio sIL-2R/ferritina > 2 , LDH $> 1000 \text{ U/L}$ e hipofibrogenemia ($< 1.5 \text{ g/L}$) é altamente sugestiva de LHH reativa.¹¹⁰

Neste grupo de doentes a presença de hiperferritinémia deve ser distinguida de sobrecarga férrica induzida por múltiplas transfusões sanguíneas e as citopenias esclarecidas através de aspirados medulares sequenciais, que permitam a distinção entre supressão hematopoiética induzida pela quimioterapia e LHH ativa.

Deve ser igualmente efetuada a pesquisa criteriosa de adenomegalias ou lesões cutâneas suspeitas, e posterior biópsia.

TRATAMENTO

A sobrevivência dos doentes com LHH ativa sem tratamento é em média apenas 2 meses, o que torna o diagnóstico da síndrome e da sua etiologia (quando possível) e início da terapêutica precoce absolutamente fulcral.

Uma vez identificada a etiologia, em doentes estáveis e sem critérios de gravidade, a terapêutica de primeira linha deve ser dirigida, mantendo-se o doente sobre vigilância. Assim, no caso de infeção deve ser instituída antibioterapia, terapêutica antifúngica, antiparasitária ou antiviral de acordo com o agente infeccioso. Nos processos virais pode ponderar-se a associação de Imunoglobulina EV. Em doentes com infeção por EBV está recomendado o uso de Rituximab, anticorpo monoclonal anti-CD20, contudo a infeção preferencial dos linfócitos T nestes doentes parece condicionar a sua eficácia. Nas neoplasias deve iniciar-se quimioterapia dirigida (nos casos de maior gravidade com eventual acréscimo de corticoterapia) e nas doenças autoimunes imunossupressão.

Por outro lado, nos doentes com agravamento clínico, analítico, com deterioração da função respiratória, aumento das transaminases, bilirrubina, ferritina, sCD25 e dos parâmetros da coagulação e disfunção multiorgânica progressiva, parâmetros de pior prognóstico, deve ser equacionada uma abordagem agressiva inicial, inclusivamente prévia à obtenção dos resultados do estudo etiológico, nomeadamente genético (moroso), uma vez que a abordagem é semelhante nas variantes primárias e reativas da doença. Nesta situação é legítimo o uso de corticoterapia em altas doses, com eventual associação de imunoglobulina EV, como terapêutica de primeira linha.

Em doentes em que o diagnóstico é tardio ou cujas complicações condicionem risco de vida, não raras vezes internados em UCI, a LHH pode mimetizar outras síndromes como sépsis e choque. A maior amplitude de elevação dos parâmetros inflamatórios, designadamente da ferritina apoia o diagnóstico de LHH.

O primeiro protocolo para o tratamento desta síndrome foi publicado pela *Histiocyte Society* em 1994(HLH-94) compreendendo: **terapêutica de indução**, com o objetivo de suprimir o estado hiperinflamatório potencialmente fatal e **terapêutica de continuação**, nos doentes com envolvimento do SNC, formas refratárias/reativas, defeitos genéticos ou disfunção de células NK persistente. Nestes doentes a terapêutica de continuação deve ser encarada como uma fase transitória, o mais breve possível, dado estar associada a elevado risco de infeção, reativação e síndromes mielodisplásicas e leucemia (dose cumulativa de Etoposido), para a realização de **transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos**. O protocolo considerada ainda **a terapêutica de resgate**.⁴

Terapêutica de Indução⁴

Segundo o Protocolo HLH-94 a terapêutica de indução, com duração de 8 semanas, deve incluir:

- **Etoposido 150mg/m² IV** (se < 10Kg, 5mg/Kg/dose) semanalmente (duas doses por semana nas duas primeiras semanas).
- **Dexametasona** diariamente em doses decrescentes. (10mg/m² → 5mg/m² → 2.5mg/m² → 1.25mg/m²). Posologia Oral ou **IV** (IV preferencial como terapêutica inicial)
- **Metotrexato** (se < 1ano, 6/8mg; 1 a 2 anos, 8/10mg; 2 a 3 anos, 10/12mg; > 3 anos, 12/15mg) + **Hidrocortisona 15mg intratecal**, semanalmente, se comprometimento do SNC, identificável por manifestações clínicas, alterações da

punção lombar com pleiocitose do LCR, ou da RM-CE, sem melhoria após 2 semanas de tratamento com Etoposido + Dexametasona.

Manter terapêutica até uma semana após resolução clínica e laboratorial.

HLh-94 INDUÇÃO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
VP-16 IV	**	**	*	*	*	*	*	*
Dexametasona IV/PO	10mg/m ² /dia		5mg/m ² /dia		2,5mg/m ² /dia		1,25mg/m ² /dia	
MTX + HC IT			*	*	*	*	*	...

Tabela 4- Terapêutica de Indução segundo o Protocolo HLH-94. (Adaptado de protocolo do serviço de Hematologia do H. Stª Maria). VP-16 (etoposido), MTX (metotrexato), HC(hidro cortisona), IV(intravenoso), PO (posologia oral), IT(intra-tecal)

Nos doentes com **SAM** no contexto de doença autoimune, o protocolo HLH-94 deve ser substituído por corticóide em monoterapia ou com eventual associação de Ciclosporina A nos casos em que não há resposta. Assim, estão recomendados pulsos de metilprednisolona IV 30 mg/kg em três dias consecutivos, seguidos de 2-3 mg/kg/dia em 2 a 4 tomas diárias. Se a resposta não for imediata, deve ser iniciada Ciclosporina A IV (2-5 mg/kg/dia)¹¹¹

Aquando do início da terapêutica deve ser pedida tipagem HLA para evitar atrasos no TPH em potenciais candidatos.

Devem ver monitorizados sinais de melhoria, de agravamento/reativação como deterioração da função hepática, agravamento das citopénias, elevação da ferritina sérica, sCD25 e sCD163 ou de toxicidade. A ocorrência de febre de novo deve obrigar ao diagnóstico diferencial de infeções oportunistas/reativação/febre neutropénica. Em caso de suspeita de infeção iniciar antibioterapia de largo espetro.

Deve ser igualmente realizado o controlo da TA (HTA nestes doentes está associada a maior risco de encefalopatia reversível posterior), bem como vigilância apertada em relação ao estado de consciência ou outras manifestações neurológicas e da função cardíaca. O envolvimento do CNS está associado a maior morbilidade a longo prazo.

A terapêutica de suporte nestes doentes deve ainda incluir profilaxia contra *Pneumocystis jirovecii* (Co-trimoxazol 960mg 12/12h 3x/semana PO), fúngica (Fluconazol 400mg/dia PO) e Imunoglobulina IV 0.5g/Kg 4/4 semanas.

A heparina profilática não está recomendada, uma vez que a trombocitopenia e disfunção plaquetária que alguns doentes apresentam, a coagulopatia e o próprio estado

inflamatório se encontram associados a elevado risco hemorrágico nestes doentes. A contagem de plaquetas desejável deve ser $>50 \times 10^9/l$.

Dos doentes tratados com o protocolo HLH-94, 50% apresentaram remissão completa, 30% remissão parcial e 20% morreram antes de realizar transplante, sendo que o maior número de mortes ocorreu nas primeiras semanas de tratamento, devido a morbilidade pré-existente ou doença refratária primária.

Um novo ensaio clínico, HLH-2004, levado a cabo por Henter et al (2014), ainda em curso, associa à terapêutica de indução Ciclosporina A, contudo o seu potencial efeito agravante da função hepática e o fato dos riscos/benefícios neste contexto não estarem definidos, levam a que não se encontre indicada. Além do mais, a terapêutica tripla parece estar associada a neurotoxicidade.¹⁰²

Mahlaoui et al (2007) sugerem um esquema alternativo com corticoide, Ciclosporina A e ATG(Globulina Anti-timócito), tendo obtido uma taxa de remissões completas de 73%, todavia esta parece estar associada a maior taxa de recidivas, sem melhoria do prognóstico a longo prazo.¹¹²

Terapêutica de Continuação⁴

Os doentes sem reativação/recidiva sob terapêutica de indução, com função imune normalizada e sem defeitos genéticos associados a LHH primária identificáveis podem suspender a terapêutica após as 8 semanas. Todavia a monitorização destes doentes deve ser criteriosa, particularmente imediatamente após a terapêutica, dado que a maioria das recidivas ocorre no 1º ano.

Por outro lado, nos doentes em que ocorre envolvimento do CNS, reativação/refratária, disfunção persistente de células NK ou defeitos genéticos deve ser iniciada terapêutica de continuação/manutenção, seguida de TPH o mais precocemente possível.

Segundo o protocolo HLH-94 a terapêutica de continuação/manutenção deve incluir:

- Pulsos de **Etoposido 150mg/m² IV** cada 2 semanas, alternando com **Dexametasona 10mg/m²/dia PO** durante 3 dias, a cada 2 semanas.
- **Ciclosporina A PO (níveis séricos alvo: 200µg/l)**, em terapêutica contínua, se função renal e hepática adequadas e TA estável.

HLH-94 – Continuação	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	...
VP-16 150mg/m ² IV	*		*		*		*	
Dexametasona 10mg/m ² PO		***		***		***		***
CsA PO	Terapêutica contínua							

Tabela 5- Terapêutica de Continuação segundo Protocolo HLH-94 (Adaptado do protocolo do serviço de Hematologia do H. Srª Maria). CsA (Ciclosporina A))

Terapêutica de Resgate

Aproximadamente 30% dos casos de LHH são refratários à terapêutica *standard*, sendo a percentagem de resposta francamente mais baixa nos adultos. Não existem à data *guidelines* consensuais quanto ao *timing* de início e esquema ideal de terapêutica de resgate. A *Histiocyte Society* recomenda o início após 2 a 3 semanas sem resposta parcial com terapêutica *standard*.

Whang et al (2015) realizaram o primeiro estudo prospetivo em adultos com LHH, tendo administrado nos casos refratários terapêutica tripla com Etoposido, Metrilprednisolona e **Doxorrubicina**. Os resultados foram bastante promissores, com resposta em 76% dos doentes, contrariamente aos obtidos em estudos prévios com outros agentes citotóxicos convencionais, sem grande eficácia.¹¹³

A terapêutica com agentes biológicos pode ser igualmente considerada, particularmente os antagonistas da IL-1, **Anakinra**, IL-6, **Tocilizumab**, anti-TNF- α , **Infliximab**, e anti-CD25, **Daclizumab**. A utilização de **Alemtuzumab**, anticorpo anti-CD52, mostrou melhoria da sobrevida até TPH em idade pediátrica, com 64% de respostas parciais, nos casos refratários. Nos adultos a importância desta rápida depleção de células CD52 induzida pelo Alemtuzumab não está tão bem esclarecida.¹¹⁴

O Tocilizumab tem ainda sido utilizado com sucesso no manuseamento da hipercitocinémia em doentes sob imunoterapia com células T modificadas com recetor de antígeno quimérico (*chimeric antigen receptor-modified T cells* - CART). De fato, o tratamento com células CART anti-CD19, com atividade anti-tumoral e eficácia clínica reiteradamente descrita na literatura, induz uma síndrome de libertação de citocinas, por um lado necessária à sua ação efetora, mas por outro a toxicidade, com elevação de IFN- γ e outras citocinas associadas a LHH e SAM como a IL-10 e a IL-6. Nestes doentes, o uso do antagonista do recetor da IL-6 Tocilizumab tem-se revelado eficaz.¹¹⁵

Em modelos animais o tratamento com **Ruxolitinib**, inibidor das JAK (*Janus Kinases*) 1 e 2, levou a melhoria franca do quadro clínico de LHH, sendo este fármaco considerado muito promissor.¹¹⁶

Nos doentes com resposta inicial à terapêutica *standard*, mas posterior recidiva poderá ser tentada terapêutica de resgate com os mesmos fármacos em doses superiores.

Transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos

O transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos (alo-TPH) é a única terapêutica curativa disponível para a LHH. A sua realização em idade pediátrica após regime de condicionamento mieloablativo tem sido difundida, sendo a sobrevivência a longo prazo estimada em 45% a 65% em diversas séries publicadas, em doentes com LHH ou outras síndromes hereditárias associadas à doença, submetidos a este regime. Nos adultos o recurso ao transplante é ainda controverso, estando indicado nas recidivas ou doença refratária /progressiva apesar de terapêutica intensa ou aquando do envolvimento do SNC.

A pesquisa de dador deve iniciar-se desde o diagnóstico nos potenciais candidatos, uma vez que o período de tempo até ao transplante é um fator agravante da morbilidade e mortalidade. A compatibilidade HLA e a atividade da LHH aquando do regime de condicionamento pré-transplante são igualmente fatores relevantes para o sucesso/insucesso.

Na ultima década, a experiência em populações pediátricas tem sugerido que doentes com LHH submetidos a regimes de condicionamento de intensidade reduzida pré-TPH apresentam melhor prognóstico. Em 2006, Cooper et al descreveram uma melhoria da sobrevida a longo prazo, estimada em 75%, num grupo de doentes com LHH, XLP e Chédiak-Higashi submetidos a estes regimes.¹¹⁷ Esta evidência foi corroborada pelo estudo comparativo direto entre o condicionamento mieloablativo e de baixa intensidade levado a cabo por Rebbeck et al (2010), em que foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas na sobrevida a 3 anos após TPH, estimada em 43% nos doentes submetidos a regimes de condicionamento mieloablativos e 92% nos de intensidade reduzida. Verificou-se ainda redução da mortalidade precoce (nos primeiros 180 dias) e da ocorrência de GVHD aguda graus II e III (14% nos mieloablativos vs 8% nos de intensidade reduzida). Pelo contrário, a incidência de quimerismo misto dador/recetor foi superior, tendo sido os doentes neste caso tratados com imunossupressão em baixas doses e infusão de leucócitos do dador, com sucesso.¹¹⁸

Assim, o regime pré-transplante proposto para os doentes com LHH deve incluir: **Fludarabina IV** (150mg/m² se >10Kg, 5 mg/Kg se <10Kg), **Melfalano IV** (140mg/m² se >10 Kg, 4.7mg/Kg se <10Kg) e **Alemtuzumab IV 0,2mg/kg/dia**.

Nestes doentes, deve ser realizada profilaxia de Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (graft-versus-host disease – GVHD) com Ciclosporina A ou Tacrolimus, podendo ser equacionada a associação de Metilprednisolona, profilaxia antiviral, CMV (se dador seropositivo) e HSV, profilaxia fúngica, anti *Pneumocistis jirovecii*, inicialmente com Pentamidina e após recuperação medular com Co-Trimoxazol. Deve ainda ser administrada Imunoglobulina IV e G-CSF até melhoria da neutropénia.

Durante os primeiros meses pós-TPH deve ser feita monitorização semanal do quimerismo, dada a elevada probabilidade de desenvolvimento de quimerismo misto (embora não se conheça o nível seguro/eficaz de quimerismo nesta patologia valores < 10% têm sido associados a recidiva de LHH). No caso de atingimento prévio do SNC deve ser feita avaliação por PL e RM-CE seriadas nos primeiros 100 dias após transplante. Se persistência das alterações associar terapêutica intratecal.

CONCLUSÃO

A Linfocitose Hemafagocítica continua a representar um desafio quanto ao diagnóstico e terapêutica precoce, particularmente em adultos, malgrado o crescente conhecimento e consciência para a síndrome.

Novos marcadores como o índice sIL-2R/ferritina, promissores no diagnóstico precoce de LHH associada a Linfoma, um dos principais desencadeantes da síndrome em adultos, bem como a evidência de diferenças significativas na especificidade e sensibilidade dos marcadores vigentes consoante o grupo etário, torna urgente a revisão dos critérios de diagnóstico HLH-2004.

Do mesmo modo, a resposta à terapêutica *standard* francamente mais baixa em adultos, alerta para a necessidade de otimizar os esquemas terapêuticos, assumindo os agentes biológicos um papel bastante promissor. A associação da Ciclosporina A durante a fase de indução encontra-se ainda em estudo, não sendo à data indicada.

O transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos após regime de condicionamento de intensidade reduzida tem vindo a ser opção preferencial em idade pediátrica, permanecendo a sua realização controversa em idade adulta.

REFERÊNCIAS

1. Scott RB & Robb-Smith AHT (1939) Histiocytic medullary reticulosis, *Lancet*;234(6047):194-198.
2. Farquhar JW & Claireaux AE (1952) Familial haemophagocytic reticulosis. *Arch Dis Child*, 27(136):519-525.
3. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F et al (1999) Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 286(5446):1957-1959.
4. Henter JJ, Aricò M, Egeler RM et al (1997) HLH-94: a treatment protocol for hemophagocytic lymphohistiocytosis. HLH study Group of the Histiocyte Society. *Med Pediatr Oncol*. May;28(5):342-7.
5. Bode S, Ammann S, Al-Herz W et al (2015) The syndrome of HLH in primary immunodeficiencies: implications for differential diagnosis and pathogenesis. *Haematologica*. Jul; 100(7): 978–988.
6. Fautsch Y & Grunebaum E (2014) Hemophagocytic lymphohistiocytosis and primary immune deficiency disorders. *Clin Immunol*.155(1):118-25
7. Zhang L, Zhou J, Sokol L (2014) Hereditary and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Cancer Control*;21(4):301-12.
8. C Gholam, S Grigoriadou, K C Gilmour, H B Gaspar (2011) Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in the genetic basis, diagnosis and management. *Clin Exp Immunol*; 163(3): 271–283.
9. Rivière S, Galicier L, Coppo P et al (2014) Reactive hemophagocytic syndrome in adults: a retrospective analysis of 162 patients. *Am J Med*;127(11):1118.
10. Li J, Wang Q, Zheng W, Ma J et al (2014) Hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical analysis of 103 adult patients. *Medicine (Baltimore)*;93(2):100-5.
11. Parikh SA, Kapoor P, Letendre L et al (2014) Prognostic factors and outcomes of adults with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Mayo Clin Proc*;89(4):484.
12. Nagafuji K, Nonami A, Kumano T, et al (2007) Perforin gene mutations in adult-onset hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica*;92(7): 978-981.
13. Clementi R, Emmi L, Maccario R, et al (2002) Adult onset and atypical presentation of hemophagocytic lymphohistiocytosis in siblings carrying PRF1 mutations. *Blood*;100(6):2266-2267.
14. Henter JJ, Elinder G, Söder O et al (1991) Incidence in Sweden and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr Scand*;80(4):428-35.
15. Schram AM & Berliner N (2015) How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis in the adult patients. *Blood*;125:2908-2914;
16. Janka GE & Lehmborg K (2013) Hemophagocytic lymphohistiocytosis: pathogenesis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 2013:605-11.
17. Niece JA, Rogers ZR, Ahmad N et al (2010) Hemophagocytic lymphohistiocytosis in Texas: observations on ethnicity and race. *Pediatr Blood Cancer*; 54(3):424-8.
18. Ishii E, Ohga S, Imashuku S et al (2007) Nationwide survey of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Int J Hematol*;86(1):58-65.
19. Gurgey A, Unal S, Okur H, et al (2008) Neonatal primary hemophagocytic lymphohistiocytosis in Turkish children. *J Pediatr Hematol Oncol*;30(12): 871-876.
20. Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, et al (2006) Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat*;27(1):62-8.
21. Horne A, Ramme KG, Rudd E, et al (2008) Characterization of PRF1, STX11 and UNC13D genotype-phenotype correlations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*;143(1):75-83.
22. Russell JH & Ley TJ (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*;20:323-70.
23. Trapani J & Smyth MJ (1993) Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: Multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *Immunology and Cell Biology* ;71, 201-208

24. Fan Z & Zhang (2005) Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cell Mol Immunol.*;2(4):259-64.
25. Cetica V, Pende D, Griffiths G et al (2010) Molecular Basis Of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Haematologica*; 95: 538-541
26. Schneider EM, Lorenz I, Müller-Rosenberger M et al (2002) Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytolysis but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis. *Blood.*;100(8):2891-8.
27. Michael B, Jordan, Carl E. Allen, Sheila Weitzman, et al (2011) How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*;118:4041-4052
28. Lu G, Xie ZD, Shen KL et al (2009) Mutations in the perforin gene in children with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Chin Med J (Engl.)*;122(23):2851-5.
29. Usmani GN, Woda BA, Newburger PE (2013) . Advances in understanding the pathogenesis of HLH. *Br J Haematol.*;161(5):609-22.
30. Henter J, Elinder G, Olle S et al (1991) Hypercytokinemia in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Blood.*;78(11):2918-22.
31. Takada H, Ohga S, Mizuno Y et al (2004) Increased IL-16 levels in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol.*;26(9):567-73.
32. Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, et al(2004) An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood.*;104(3):735-43
33. Jessen B, Kögl T, Sepulveda F, et al (2011) Graded defects in cytotoxicity determine severity of hemophagocytic lymphohistiocytosis in humans and mice. *Front Immunol.* 2013; 4: 448.
34. Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, et al (2011) Perforin is a critical physiologic regulator of T-cell activation. *Blood.*;118(3):618-26
35. Hermans I F, Ritchie D S, Yang J, et al (2000) CD81 T Cell-Dependent Elimination of Dendritic Cells In Vivo Limits the Induction of Antitumor Immunity. *J Immunol*; 164:3095-3101;
36. Yang J, Huck SP, McHugh RS, et al(2006) Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8+ T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;103(1):147-52.
37. Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE, et al(2010) Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med.*;207(6):1333-43.
38. Meeths M, Bryceson YT, Rudd E, et al (2010) Clinical presentation of Griscelli syndrome type 2 and spectrum of RAB27A mutations. *Pediatr Blood Cancer.*;54(4):563-72
39. Aslan D, Sari S, Derinöz O, et al (2006) Griscelli syndrome: description of a case with Rab27A mutation. *Pediatr Hematol Oncol.*;23(3):255-61.
40. Kaya Z, Ehl S, Albayrak M et al (2011) A novel single point mutation of the LYST gene in two siblings with different phenotypic features of Chediak Higashi syndrome. *Pediatr Blood Cancer.*;56(7):1136-9.
41. Patisroglu T, Akar H, Van den Burg (2014) X-linked severe combined immunodeficiency due to a novel mutation complicated with hemophagocytic lymphohistiocytosis and presented with invagination: A case report. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*; 4(3): 174–176.
42. E. Grunebaum, J. Zhang, H. Dadi, et al (2000) Haemophagocytic lymphohistiocytosis in X-linked severe combined immunodeficiency. *Br J Haematol*
43. Valentine G, Thomas TA, Nguyen T, et al (2014) Chronic granulomatous disease presenting as hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case report. *Pediatrics.*;134(6):e1727-30
44. Zhang L, Zhou J, Sokol L (2014) Hereditary and Acquired Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Cancer Control*; Vol. 21, No. 4
45. McClain K, Gehrz R, Grierson H, et al (1988) Virus-associated histiocytic proliferations in children. Frequent association with Epstein-Barr virus and congenital or acquired immunodeficiencies. *Am J Pediatr Hematol Oncol.*;10(3):196.
46. Risdall RJ, Brunning RD, Hernandez JI, et al (1984) Bacteria-associated hemophagocytic syndrome. *Cancer*;54(12):2968.

47. Chen TL, Wong WW, Chiou TJ (2003) Hemophagocytic syndrome: an unusual manifestation of acute human immunodeficiency virus infection. *Int J Hematol*;78(5):450.
48. Janka GE & Lehmborg K (2014) Hemophagocytic syndromes--an update. *Blood Rev.*;28(4):135-142
49. Chuang HC, Lay JD, Hsieh WC, et al (2007) Pathogenesis and mechanism of disease progression from hemophagocytic lymphohistiocytosis to Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma: nuclear factor-kappa B pathway as a potential therapeutic target. *Cancer Sci.*;98(9):1281-7.
50. Chuang HC, Lay JD, Hsieh WC (2005) Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome. *Blood*;106(9):3090-6.
51. Lay JD, Tsao CJ, Chen JY, et al (1997) Upregulation of Tumor Necrosis Factor Gene by Epstein-Barr Virus and Activation of Macrophages in Epstein-Barr Virus-infected T Cells in the Pathogenesis of Hemophagocytic Syndrome *J Clin Invest.*; 100(8): 1969–1979.
52. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, López-Guillermo A, et al (2014) Adult haemophagocytic syndrome. *Lancet*. 2014 Apr 26;383(9927):1503-16
53. Rivière S, Galicier L, Coppo P et al (2014) Reactive hemophagocytic syndrome in adults: A multicenter retrospective analysis of 162 patients. *American Journal of Medicine*
54. Machaczka M, Vaktas J, Klimkowska M et al (2011) Malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: a retrospective population-based analysis from a single center. *Leukemia & Lymphoma*; 52(4):613-619
55. Sano H, Kobayashi R, Tanaka J, et al (2014) Risk factor analysis of non-Hodgkin lymphoma-associated haemophagocytic syndromes: a multicentre study. *Br J Haematol*;165(6):786-792.
56. Veerakul G, Sanpakit K, Tanphaichitr VS et al (2002) Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: an analysis of etiology and outcome. *J Med Assoc Thai*;85 Suppl 2:530-541
57. Lehmborg K, Sprekels B, Nichols KE et al (2015) Malignancy-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis in children and adolescents. *Br J Haematol*
58. Menard F, Besson C, Rince P et al (2008) Hodgkin lymphoma-associated hemophagocytic syndrome: a disorder strongly correlated with Epstein-Barr virus. *Clin Infect Dis.*;47(4):531-534
59. Chang YH, Lu PJ, Lu MY (2009) Sequential transplants for relapse of Hodgkin disease and hemophagocytic lymphohistiocytosis: a treatment dilemma. *J Pediatr Hematol Oncol.*; 31(10):778-781
60. Shimazaki C, Inaba T, Nakagawa K et al (2000) B-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Leuk Lymphoma*;38(1-2):121-130
61. Celkan T, Berrak S, Kazanci E et al (2009) Malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in pediatric cases: a multicentre study from Turkey. *Turk J Pediatr*;51(3):207-213
62. Trebo MM, Attarbaschi A, Mann G et al (2005) Histiocytosis following T-acute lymphoblastic leucemia: a BFM study. *Leuk Lymphoma*;46(12):1735-1741
63. Imashuku S (2007) Etoposide-related secondary acute myeloid leucemia (t-AML) in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*;48(2):121-123
64. Kumakura S, Ishikura H, Umegae N, et al (1997) Autoimmune-associated hemophagocytic syndrome. *Am J Med*;102:113–5
65. Wong KF, Hui PK, Chan JK, et al (1991) The acute lupus hemophagocytic syndrome. *Ann Intern Med*;114:387–90.
66. Arlet JB, Le TH, Marinho A et al (2006) Reactive haemophagocytic syndrome in adult-onset Still's disease: a report of six patients and a review of the literature. *Ann Rheum Dis*;65:1596–601. D
67. Lambotte O, Khellaf M, Harmouche H et al (2006) Characteristics and long-term outcome of 15 episodes of systemic lupus erythematosus-associated hemophagocytic syndrome. *Medicine*:169–182

68. Davì S, Minoia F, Pistorio A (2014) Performance of Current Guidelines for Diagnosis of Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*;66(10):2871–2880
69. S. Fukaya, S. Yasuda, T. Hashimoto (2008) Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of 30 cases. *Rheumatology*;47:1686–16
70. Trottestam H, Horne A, Aricò M et al (2011) Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: long-term results of the HLH-94 treatment protocol. *Blood*;118(17):4577.
71. Aricò M, Janka G, Fischer A, et al (1996) Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Leukemia*;10(2):197.
72. Palazzi DL, McClain KL, Kaplan SL (2003) Hemophagocytic syndrome in children: an important diagnostic consideration in fever of unknown origin. *Clin Infect Dis.*;36(3):306-312
73. Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, et al (2009) Characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis in neonates: a nationwide survey in Japan. *J Pediatr.*;155:235-238.e1.
74. Filipovich AH (2009) Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*; 127-31
75. Kapelari M, Fruehwirth M, Heitger A et al (2005) Loss of intrahepatic bile ducts: an important feature of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Virchows Archiv*
76. Billiau AD, Roskams T, Damme-Lombaerts RV. Macrophage activation syndrome: characteristic findings on liver biopsy illustrating the key role of activated, IFN-gamma-producing lymphocytes and IL-6- and TNF-alpha-producing macrophages. *Blood* 2005
77. Deiva K, Mahlaoui N, Beaudonnet F et al (2012) CNS involvement at the onset of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Neurology*;78(15):1150.
78. Horne A, Trottestam H, Aricò M, et al (2008) Frequency and spectrum of central nervous system involvement in 193 children with haemophagocytic lymphohistiocytosis *Br J Haematol.*;140(3):327
79. Gratton SM, Powell TR, Theeler, et al (2015) Neurological involvement and characterization in acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis in adulthood. *J Neurol Sci.*;357(1-2):136-42.
80. De Armas R, Sindou P, Gelot A, et al. Demyelinating peripheral neuropathy associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis. An immuno-electron microscopic study. *Acta Neuropathol.* 2004;108(4):341.
81. Lee G, Lee SE, Ry KH(2013) Posterior reversible encephalopathy syndrome in pediatric patients undergoing treatment for hemophagocytic lymphohistiocytosis: clinical outcomes and putative risk factors. *Blood Research*;48(4)
82. Fitzgerald NE & McClain KL(2003) Imaging characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Radiol.*;33(6):392-401
83. Pagel J, Beutel K, Lehmborg K, et al (2012) Distinct mutations in STXBP2 are associated with variable clinical presentations in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL5). *Blood*;119(25):6016.
84. Zhao XW, Gazendam RP, Drewniak et al (2013) Defects in neutrophil granule mobilization and bactericidal activity in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) syndrome caused by STXBP2/Munc18-2 mutations. *Blood*;122(1):109-11.
85. Egeler RM, Shapiro R, Loechelt B et al (1996) Characteristic immune abnormalities in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol*; 18:340.
86. Bleesing J, Prada A, Siegel DM, et al (2007) The diagnostic significance of soluble CD163 and soluble interleukin-2 receptor alpha-chain in macrophage activation syndrome and untreated new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*
87. Allen CE, Yu X, Kozinetz CA et al (2008) Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.*50(6):1227-35.
88. Moore C Jr, Ormseth M, Fuchs H (2013) Causes and significance of markedly elevated serum ferritin levels in an academic medical center. *J Clin Rheumatol.*;19(6):324-8.

89. Schram AM, Campigotto F, Mullally A et al (2015) Marked hyperferritinemia does not predict for HLH in the adult population. *Blood*.;125(10):1548-52.
90. Wang Z, Wang Y, Wang J, et al (2009) Early diagnostic value of low percentage of glycosylated ferritin in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int J Hematol*.90(4):501-5. doi
91. Fardet L, Coppo P, Kettaneh A, et al (2008) Low glycosylated ferritin, a good marker for the diagnosis of hemophagocytic syndrome. *Arthritis Rheum*.;58(5):1521-7.
92. Aricò M, Danesino C, Pende D et al (2001) Pathogenesis of haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*; 114:761.
93. Otrrock ZK & Eby CS (2015) Clinical characteristics, prognostic factors, and outcomes of adult patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol*.;90(3):220-224.
94. Filipovich A, McClain K, Grom A (2010) Histiocytic disorders: recent insights into pathophysiology and practical guidelines. *Biol Blood Marrow Transplant*.;16(1 Suppl):S82-9.
95. Nikiforow S & Berliner N (2015) The unique aspects of presentation and diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Hematology*
96. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME (1985) Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol*.;135(5):3172–3177.
97. Takahiro T, Taichi H, Hiroshi Y (2014) A high sIL-2R/ferritin ratio is a useful marker for the diagnosis of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol* 93:821-826
98. Wang Z¹, Wang YN, Feng CC et al (2008) Diagnostic significance of NK cell activity and soluble CD25 level in serum from patients with secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis; 16(5):1154-7.
99. Schram AM, Mullally A, Fogerty AE et al (2014) Hemophagocytic lymphohistiocytosis: the partners healthcare experience over the past 8 years. *Blood*;124(21). Abstract 4104.
100. Bryceson Y, Pende D, Maul-Pavicic A (2012) A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* 119(12)
101. Maruoka H, Inoue D, Takiuchi Y, et al (2014) IP-10/CXCL10 and MIG/ CXCL9 as novel markers for the diagnosis of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol*.;93(3):393-401
102. Henter JI, Horne A, Arico M, et al (2007) HLH-2004: diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*.;48:124-131.
103. Goel S, Polski JM, Imran H (2012) Sensitivity and specificity of bone marrow hemophagocytosis in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Ann Clin Lab Sci*.;42(1):21-5.
104. Risdall RJ, McKenna RW, Nesbit ME, et al (1979) Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer. Sep*;44(3):993-1002.
105. Gupta A, Tyrrell P, Valani R, et al (2008) The role of the initial bone marrow aspirate in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*.;51(3):402-4.
106. Lim SH, Park S, Jang JH, et al (2016) Clinical significance of bone marrow hemophagocytosis in adult patients with malignancy and non-malignancy-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Ann Hematol*.;95(2):325-35.
107. Hejblum G, Lambotte O, Galicie L A (2014) Web-Based Delphi Study for Eliciting Helpful Criteria in the Positive Diagnosis of Hemophagocytic Syndrome in Adult Patients. *Plos One* 9(4)
108. Fardet L, Galicier L, Lambotte O (2014) Development and Validation of the HScore, a Score for the Diagnosis of Reactive Hemophagocytic Syndrome. *ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY*;66(9)
109. Fardet L, Lambotte O, Meynard JL et al (2010) Reactive haemophagocytic syndrome in 58 HIV-1-infected patients: clinical features, underlying diseases and prognosis. *Aids*;24(9):1299-1306
110. Li F, Li P, Zhang R, et al (2014) Identification of clinical features of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome (LAHS): an analysis of 69 patients with hemophagocytic syndrome from a single-center in central region of China. *Med Oncol*;31(4):1-7.
111. Schulert GS & Grom AA (2015) Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine-directed therapies. *Annu Rev Med*;66:145-59.

112. Mahlaoui N, Ouachée-Chardin M, de Saint Basile G et al (2007) Immunotherapy of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with antithymocyte globulins: a single-center retrospective report of 38 patients. *Pediatrics*;120(3):e622–e628.
113. Wang Y, Huang W, Hu L et al (2015) Multi center study of combination DEP regimen as a salvage therapy for adult refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*;126:2186-92.
114. Marsh RA, Allen CE, McClain KL et al (2013) Salvage therapy of refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis with alemtuzumab. *Pediatr Blood Cancer*;60(1):101–109.
115. Maude S, Barrett D, Teachey D (2014) Managing Cytokine Release Syndrome Associated With Novel T Cell-Engaging Therapies. *Cancer J.*; 20(2): 119–122
116. Das R, Guan P, Sprague L et al (2016) Janus kinase inhibition lessens inflammation and ameliorates disease in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*;127:1666-75
117. Cooper N, Rao K, Gilmour K et al (2006) Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*.;107(3):1233-6
118. Rebecca A. Marsh, Gretchen Vaughn, Mi-Ok Kim et al (2010) Reduced-intensity conditioning significantly improves survival of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 116:5824-5831